

# Multidisziplinäre Untersuchung dopaminerger Mechanismen der repetitiven Störungen anhand von zwei Rattenmodellen dopaminerger Dysregulation

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie

eingereicht an der  
Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von

Dipl.-Biol. Claudia Reinel

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Werner Kloas
2. Prof. Dr. Christine Winter
3. Prof. Dr. Imke Puls

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2015



## Zusammenfassung

Repetitive Störungen manifestieren sich als Leitsymptom in der Zwangsstörung und dem Tourette-Syndrom und reichen von Zwangsgedanken zu Zwangshandlungen sowie von einfachen bis zu komplexen motorischen Tics. Diese psychiatrischen als auch neurologischen Symptome werden als enthemmte Stereotypien eines desinhibierten Basalganglien-thalamo-kortikalen (BGTC) Regelkreises verstanden. Überdies wird als neurochemisches Korrelat ein dysregulatives Dopamin-System innerhalb dieser Kerngebiete nahegelegt, welches unter anderem über ein überaktives Dopamintransporter (DAT)-System erklärt werden könnte. Der BGTC Regelkreis und das Dopamin-System sind demnach von pathophysiologischer Relevanz in der Induktion repetitiver Erkrankungen, dennoch ist unklar, wie diese beiden Systeme hierbei miteinander interagieren.

Um dieser Frage nachzugehen wurden in der vorliegenden Arbeit die dysfunktionalen Einheiten anhand von zwei Pathologiemodellen (Ratte) mit unterschiedlich induzierter Dysregulation des Dopamin-Systems in den einzelnen Kerngebieten des BGTC Regelkreises vergleichend untersucht.

Für diese Analysen wurde zum ersten Mal ein transgenes Rattenmodell mit endogener Überexpression im DAT generiert, während im validen pharmakologischen Modell über die exogene Gabe des Dopaminrezeptor-Agonisten Quinpirol (QNP) das Dopamin-System manipuliert wurde. Beide Pathologiemodelle wurden auf zwanghafte Verhaltensaspekte als primäres Krankheitsbild der repetitiven Störungen überprüft, die relevanten Neurotransmitter sowie die dopaminergen Transporter und -Rezeptoren in den einzelnen Regionen des BGTC Regelkreises auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene quantifiziert und diese gewonnenen Ergebnisse mit den erhobenen Verhaltensaspekten assoziiert.

Die Daten dieser Studie zeigten, dass sowohl die Überexpression des DAT als auch die chronische QNP-Gabe zwanghaftes Verhalten induzierte, welches sich im Gegensatz zu dem perserverativen Verhalten der transgenen Tiere als zwanghaftes Kontrollverhalten der chronisch QNP-behandelten Ratten präsentierte. Überdies führte die nahezu regionsübergreifende Überexpression des DAT vor allem in den striatalen Arealen zu einer verstärkten Genexpression des vesikulären Monoamintransporters 2 (VMAT2) als auch des Dopaminrezeptors D1 (DRD1) und des Dopaminrezeptors D2 (DRD2). Im Vergleich dazu wiesen die chronisch QNP-behandelten Tiere in den striatalen Strukturen eine Reduktion des DAT, des VMAT2 und des DRD2 auf.

Weiterhin wurde in den biochemischen Untersuchungen der transgenen Tiere ein nahezu regionsübergreifender Mangel an Dopamin und ein gesteigerter Dopamin-Metabolismus mit regionsabhängigen Serotonin-Defizit gemessen, während die Analyse der chronisch QNP-behandelten Ratten in den striatalen Regionen einen verminderten Dopamin-Umsatz ergab.

Die gesammelten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die unterschiedlichen Phänotypen mit zwanghaftem Charakter wahrscheinlich in den differenten molekularbiologischen Veränderungen des dopaminergen Systems und dessen abnormer Neurotransmission innerhalb des BGTC Regelkreises begründet sind. Die verschiedenen Symptompräsentationen der beiden Pathologiemodelle scheinen die unterschiedlichen klinischen Subtypen der Zwangsstörung darzustellen, wobei eine gemeinsame pathophysiologische Endstrecke in einer dopaminergen Dysregulation der striatalen Areale vermutet werden kann. Darüber hinaus bietet das hier vorgestellte transgene Pathologiemodell erfolgsversprechende Ansatzpunkte um als neues valides Tiermodell der repetitiven Störungen etabliert zu werden.

## Abstract

Repetitive disorders manifest as the cardinal symptom in obsessive-compulsive disorder and Tourette syndrome. The symptoms range from compulsive acts to obsessive thoughts and from simple to complex motor tics. These psychiatric and neurologic symptoms are understood as disinhibited stereotypies of a basal ganglia-thalamo-cortical (BGTC) circuit. Furthermore, it is suggested that a dysregulated dopamine system within this circuit is the underlying neurochemical correlate, which could be among others, explained by an overactive dopamine transporter (DAT). Hence, the BGTC circuit and the dopamine system are of pathophysiological relevance in the induction of repetitive disorders, but at this point it is still unclear how these two systems interact with each other.

The aim of this study was to investigate the dysfunctional unities within the BGTC circuit by comparing two pathological rat models with different induced dopaminergic dysregulation. Therefore we created for the first time a DAT overexpressing rat model, while the dopamine system of the valid pharmacological model was manipulated by acute and chronic application of the dopamine receptor agonist quinpirol (QNP). Both models were tested for compulsive behavior as the primary disease of repetitive disorders, relevant neurotransmitters as well as dopaminergic transporters and -receptors within the single areas of the BGTC system were quantified on a molecular and biochemical level and these results were associated with the compiled behavioral aspects.

The data of this study showed that the overexpression of DAT as well as the chronic QNP treatment induced compulsive behavior. In contrast to the perseverative behavior of the transgenic model, the chronic QNP-treated rats demonstrated a compulsive control behavior. Furthermore, the DAT-overexpressing rats had increased levels of primarily striatal vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2), dopamine receptor D1 (DRD1) and dopamine receptor D2 (DRD2). In contrast, the chronic QNP-treated animals showed a reduction of striatal DAT, VMAT2 and DRD2. Moreover, the upregulated DAT resulted in a broad dopamine reduction with an increase in dopamine metabolism and a regional deficit in serotonin, while chronic QNP-treated rats showed a reduction in striatal dopamine turnover.

In sum, these results suggest that different phenotypes of compulsive behavior caused by different alterations of dopaminergic transporters/receptors and an abnormal dopamine neurotransmission within the BGTC circuit. It seems that the different symptoms represent different clinical subtypes of obsessive-compulsive disorder, while a common

pathophysiological endpoint can be assumed in dysregulations of the striatal dopamine system. In addition, the presented transgenic model provides the opportunity to be established as a new valid animal model of repetitive disorders.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	III
<b>Abstract</b> .....	V
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	X
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	XI
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	XII
<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Hintergrund und Herleitung der Studie.....	1
1.2 Die Zwangsstörung - Kernsymptom der repetitiven Erkrankungen .....	2
1.3 Erklärungsansätze zur Ätiologie der Zwangsstörung.....	3
1.3.1 Neuroanatomisches Modell.....	3
1.3.2 Neurochemisches Modell.....	5
1.4 Dopaminerge Neurotransmission und pathophysiologische Hypothese.....	8
1.5 Pathologiemodelle der Studie.....	11
1.6 Zielsetzung der Studie.....	11
<b>2. Material</b> .....	13
2.1 Chemikalien .....	13
2.2 Fertiglösungen und Kits .....	15
2.3 Antikörper und Genexpression Assays.....	16
2.4 Lösungen und Pufferansätze .....	17
2.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	19
2.6 Software .....	22
2.7 Versuchstiere.....	22
<b>3. Methoden</b> .....	23
3.1 Generierung und erste Charakterisierung der transgenen Tiere.....	23
3.1.1 Konstruktgenerierung und klassische Mikroinjektion .....	23
3.1.2 Genotypisierung .....	25
3.1.2.1 Isolierung der genomischen DNA.....	25
3.1.2.2 PCR-Analysen und Agarose-Gelelektrophorese.....	25
3.1.3 Allgemeine Charakterisierung.....	26
3.2 Phänotyp-Induktion des pharmakologischen Pathologiemodells .....	27
3.3 Zwanghaftes Kontrollverhalten auf dem offenen Feld .....	28

3.4 <i>Post mortem</i> Gewebe-Präparation.....	29
3.5 Quantitative PCR-Analysen .....	30
3.5.1 Isolierung der Gesamt-RNA und cDNA-Synthese .....	30
3.5.2 Relative Quantifizierung der mRNA.....	32
3.6 Protein-Analysen.....	33
3.6.1 Isolierung der Gesamt-Proteinmenge.....	33
3.6.2 TaqMan® Protein Expression Assay-Methode.....	33
3.6.2.1 Herstellung der Assay-Proben.....	34
3.6.2.2 TPA-Analysen.....	37
3.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot .....	38
3.6.3.1 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine.....	38
3.6.3.2 Relative Quantifizierung der Proteine.....	39
3.7 Biochemische Analysen .....	40
3.7.1 Gewebeaufbereitung.....	40
3.7.2 Neurochemische Messungen.....	40
3.8 Statistische Auswertungen .....	41
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
4.1 Generierung und erste Charakterisierung der transgenen Tiere.....	42
4.1.1 Generierung .....	42
4.1.2 Genotypisierung .....	42
4.1.3 Allgemeine Auffälligkeiten.....	43
4.2 Biochemische Analysen des transgenen Pathologiemodells.....	46
4.2.1 DA, 5-HT, GABA und Glu .....	46
4.2.2 DOPAC, HVA, 5-HIAA und Glutamin .....	48
4.2.3 Dopaminerge- und serotonerge Umsatzrate.....	50
4.3 Zwanghaftes Kontrollverhalten auf dem offenen Feld .....	52
4.3.1 Verhaltensbeobachtung des transgenen Pathologiemodells.....	52
4.3.2 Verhaltensbeobachtung des pharmakologischen Pathologiemodells.....	52
4.4 Quantitative PCR-Analysen .....	54
4.4.1 DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des transgenen Pathologiemodells.....	54
4.4.2 DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des pharmakologischen Pathologiemodells .....	57
4.5 Protein-Analysen.....	60



4.5.1 TaqMan®-Protein-Expression-Assay-Methode.....	60
4.5.2 DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des transgene Pathologiemodells.....	61
4.5.3 DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des pharmakologischen Pathologiemodells .....	62
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>65</b>
5.1 Auswirkungen der unterschiedlichen dopaminergen Manipulationen auf die molekularbiologische Ebene und den Neurotransmitterhaushalt.....	65
5.1.1 Effekte der DAT-Überexpression auf das DA-System .....	65
5.1.2 Effekte der DAT-Überexpression auf den Neurotransmitter 5-HT .....	67
5.1.3 Effekte der DAT-Überexpression auf den Neurotransmitter GABA.....	68
5.1.4 Effekte der DA-Rezeptor vermittelten Manipulation auf molekularbiologischer Ebene DAerger Einheiten.....	69
5.2 Verhaltenscharakterisierungen der beiden Pathologiemodelle .....	70
5.2.1 Allgemeine Aspekte des transgenen Pathologiemodells.....	70
5.2.2 Ein potentieller Phänotyp perserverativen Verhaltens der transgenen Tiere .....	73
5.2.3 Zwanghaftes Kontrollverhalten der chronisch QNP-behandelten Tiere .....	75
5.3 Gegenüberstellung der beiden Pathologiemodelle und Fazit.....	76
5.4 Ausblick .....	78
<b>Anhang .....</b>	<b>80</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>99</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>100</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>102</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Anatomisches Konzept der Basalganglien-thalamo-kortikalen Regelschleife unter physiologischen Bedingungen.....	3
Abb. 1.2: Schematische Abbildung der dopaminergen Projektionsbahnen .....	6
Abb. 1.3: Anatomisches Konzept des Basalganglien-thalamo-kortikalen Regelkreises mit dopaminerger Innervation zugunsten des direkten Weges .....	7
Abb. 1.4: Schematische Abbildung der dopaminergen Neurotransmission.....	9
Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Injektionskonstruktes .....	23
Abb. 3.2: Generierung des transgenen Pathologiemodells mittels Mikroinjektion .....	24
Abb. 3.3: Phänotypinduzierung des pharmakologischen Pathologiemodells .....	27
Abb. 3.4: Schematische Darstellung des modifizierten offenen Feldes.....	28
Abb. 3.5: Schematischer Ablauf der Taqman® Protein Expression Assay-Methode.....	34
Abb. 4.1: Repräsentative Abbildung zur Identifizierung transgener Tiere .....	43
Abb. 4.2: Verhaltensauffälligkeiten im Körpergewicht, der Futtereinnahme und der..... spontanen Lokomotion	45
Abb. 4.3: Neurotransmitter-Mengen für DA, 5-HT, GABA und Glu.....	47
Abb. 4.4: Umsatzraten für den Neurotransmitter Dopamin und Serotonin .....	50
Abb. 4.5: Repräsentativer Darstellung der Entwicklung eines zwanghaften Kontrollverhaltens und zwanghaftes Kontrollverhalten anhand der analysierten Parameter .....	53
Abb. 4.6: mRNA Expressionslevel von DAT, VMAT2, DRD1, DRD2 des transgenen Pathologiemodells .....	56
Abb. 4.7: mRNA Expressionslevel von DAT, VMAT2, DRD1, DRD2 des pharmakologischen Pathologiemodells.....	59
Abb. 4.8: Protein Expression von DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des transgenen Pathologiemodells und repräsentative Immunooblots .....	61
Abb. 4.9: Protein Expression von DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des pharmakologischen Pathologiemodells und repräsentative Immunooblots .....	63
Abb. S1: Repräsentative Immunoblots biotinylierter Antikörper.....	80
Abb. S2: Repräsentative Darstellung der TaqMan®-Protein Expression Assay-Methode.....	80

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Liste der verwendeten Chemikalien.....	13
Tab. 2.2: Liste der verwendeten Fertiglösungen und Kits.....	15
Tab. 2.3: Liste der verwendeten Antikörper und Genexpression Assays .....	16
Tab. 2.4: Liste der verwendeten Lösungen und Pufferansätze .....	17
Tab. 2.5: Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
Tab. 2.6: Liste der verwendeten Software.....	22
Tab. 3.1 A: Primer und Sequenzen der PCR-Analysen .....	25
Tab. 3.1 B: Pipettierschema für 10 Reaktionen der PCR.....	25
Tab. 3.1 C: Thermozykler-Programm für die PCR.....	26
Tab. 3.2: Liste der <i>post mortem</i> Gehirnscheiben und Gewebestanzen nach Bregma. ....	30
Tab. 3.3 A: Pipettierschema für die cDNA-Synthese. ....	31
Tab. 3.3 B: Thermozykler-Programm für die cDNA-Synthese .....	31
Tab. 3.4 A: Pipettierschema für TaqMan® Gene Expression Assay-Methode. ....	32
Tab. 3.4 B: Zyklen-Protokoll des StepOne™ Real-Time PCR-Systems. ....	32
Tab. 3.5: Kriterien der Antikörper für eine TPA-Analyse .....	34
Tab. 3.6 A: Biotinylierung der Antikörper.....	35
Tab. 3.6 B: Dialyse der biotinylierten Antikörper.....	35
Tab. 3.6 C: Pipettierschema für den Forced Proximity-Test.....	36
Tab. 3.6 D: Zyklen-Protokoll des StepOne™ Real-Time PCR-Systems. ....	36
Tab. 3.6 E: Pipettierschema der Assay-Proben.....	36
Tab. 3.7: Zyklen-Protokoll des StepOne™ Real-Time PCR-Systems.....	37
Tab. 4.1: Quantitative Verteilung der Genotypen .....	42
Tab. 4.2: Kleintierscreening eines homozygoten Weibchens und dessen Wildtyp.....	44
Tab. 4.3: Neurotransmitter-Mengen für DOPAC, HVA, 5-HIAA und Glutamin .....	49
Tab. S1: Liste der verschiedenen Etablierungsschritte der TaqMan® Protein Expression Assay-Methode.....	81

## Abkürzungsverzeichnis

5-HIAA	5-Hydroxyindolylessigsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
3-MT	3-Methoxythyramin
aa	Aminosäuren
ACC	anteriöer cingulärer Kortex
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
AST	Aspartat-Aminotransferase
bp	Basenpaare
BGTC	Basalganglien-thalamo-kortikal
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cg1	cingulärer Kortex Areal 1
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CPu	Nucleus caudatus und Putamen
C <sub>T</sub>	Threshold-Cycle
D1	D1-ähnliche Dopaminrezeptoren
D2	D2-ähnliche Dopaminrezeptoren
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DAT-KO	Dopamintransporter-Deaktivierung
DATr	Dopamintransporter-Primer (rückwärts)
DM	dorsomedialer Thalamus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenyessigsäure
DRD1/2/3/4/5	Dopaminrezeptor Unterform 1/2/3/4/5
DSM-V	Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen (5. Ausgabe)

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F0	erste transgene Individuen (Startindividuen)
F1/2/3	Folgegeneration 1/2/3
FPT	Forced Proximity-Test
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFAP	saures Gliafaserprotein
GLDH	Glutamatdehydrogenase
Glu	Glutamat
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GP	Globus pallidus
GPe	Globus pallidus externus
GPI	Globus pallidus internus
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
hCG	humanes Choriongonadotropin
HPC	Hippokampus
HPLC	Hochflüssigkeitstomographie
HVA	Homovanillinsäure
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision
IgG	Immunglobulin Klasse G
IgY	Immunglobulin Klasse Y
IL	infralimbischer Kortex
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasen
LGP	lateraler Globus pallidus
LH	luteinisierendes Hormon
LO	lateral orbitaler Kortex
log	Logarithmus zur Basis 10
MAO	Monoaminoxidase
MCH	mittleres corpuskuläre Hämoglobin
MCHC	mittlere corpuskuläre Hämoglobin-Konzentration

MCV	mittleres corpuskuläres Volumen
mDAT	<i>murine</i> Dopamintransportersequenz
MGP	medialer Globus pallidus
mPFC	medialer präfrontaler Kortex
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NAc	Nucleus accumbens
NaCl	Natriumchlorid
NK	Negativkontrolle
NSEf	neuronenspezifischer Enolase-Primer (vorwärts)
OD	Optische Dichteeinheit
OF	offenes Feld
OFC	orbitofrontaler Kortex
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (Tensid)
pcDNA3	Klonierungsvektor pcDNA3
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PK	Positivkontrolle
PLA	Proximity Ligation Assays
pNSE-Ex4	neuronenspezifischer Enolase-Exon4 Expressionsvektor
poly-A	Polyadenylierungs-Schwanz
PrL	prälimbischer Kortex
QNP	Quinpirol
qPCR	quantitative-Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SD	Sprague-Dawley
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SN (c/r)	Substantia nigra (Pars compacta/Pars reticulata)
SSRI	selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
STN	Nucleus subthalamicus
SV-40	<i>Simian</i> -Virus 40

T3	Trijodthyronin
T4	Tetraiodthyronin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
TEMED	Tetramethylethylen
TH	Tyrosinhydroxylase
TPA	TaqMan® Protein-Expression-Assays
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyreoida stimulierende Hormon
UV	Ultraviolett
VMAT2	vesikulärer Monoamintransporter 2
VO	ventraler orbitaler Kortex
VTA	ventrales tegmentales Areal
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp

# 1. Einleitung

## 1.1 Hintergrund und Herleitung der Studie

Das Dopamin (DA)-System sowie die Kerngebiete des Basalganglien-thalamo-kortikalen (BGTC) Regelkreises regulieren ein weites Spektrum physiologischer Funktionen, welche Bewegungsabläufe, kognitive Prozesse und emotionale Verarbeitungsschritte beinhaltet (Cummings, 1993; Grace et al., 2007; Pallanti und Hollander, 2008; Joshua et al., 2009). Folglich wird diesen beiden Funktionseinheiten bei einer Vielzahl sehr unterschiedlicher neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen wie der Zwangsstörung, dem Tourette-Syndrom, dem Autismus oder der Depression eine bedeutende Rolle zugeschrieben (Singer und Minzer, 2003; Calderoni et al., 2014; Leon et al., 2014; Zhang et al., 2014). Viele dieser Krankheitsbilder, denen eine Dysfunktion im BGTC Regelkreis zugrunde liegt, gehen mit repetitiven Störungsbildern als stereotype und ritualisierte Verhaltensweisen auf einer gedanklichen und/oder motorischen Ebene einher (Harris und Singer, 2006; Bokor und Anderson, 2014; Calderoni et al., 2014). Ein dysregulatives DA-System innerhalb dieses Regelkreises wird mittlerweile vor allem bei der Zwangsstörung und dem Tourette-Syndrom vermehrt für die Induktion repetitiver Störungen mitverantwortlich gemacht (Singer et al., 2002, Singer und Minzer, 2003; Wong et al., 2008, Koo et al., 2010; Denys et al., 2004a, 2013). Die Ätiologie dieser unterschiedlichen neuropsychiatrischen Erkrankungen ist dennoch nicht hinreichend bekannt und der gegenwärtige Behandlungserfolg daher oftmals limitiert und insuffizient (Chamberlain et al., 2005; Bronfeld und Bar-Gad, 2013), sodass bei therapieresistenten Patienten oftmals nur noch die Methode der tiefen Hirnstimulation eine Besserung der Symptomatik ermöglichen kann (Ward et al., 2010).

Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen zwischen dem DA-System und dem BGTC Regelkreis könnten ein direktes Eingreifen in die dysfunktionalen Einheiten ermöglichen und neue Erklärungsansätze für die spätere Entwicklung spezifischer Behandlungsstrategien in den unterschiedlichen Krankheitsbildern der repetitiven Störungen vorbereiten.



## **1.2 Die Zwangsstörung - Kernsymptom der repetitiven Erkrankungen**

Wie bereits erläutert, sind die repetitiven Störungen als solches keine Krankheitsdiagnose und werden in den Klassifikationssystemen (DSM-V; ICD-10) nicht erfasst. Im Allgemeinen umfassen diese sich wiederholende Verhaltensmuster auf kognitiver (Zwangsgedanken) und/oder motorischer Ebene (Zwangshandlungen) sowie einfache bis komplexe motorische Tics (Pallanti und Hollander, 2008; Leckman et al., 2010; Gomes de Alvarenga et al., 2012). Im Zentrum dieses Spektrums steht die Zwangsstörung mit ihren sich wiederholend aufdrängenden Gedanken, Befürchtungen oder Impulsen sowie ritualisierten Verhaltensweisen. Diese Erkrankung wird auf eine Prävalenz von 1-3 % geschätzt und tritt somit häufiger wie die Schizophrenie oder die Panikstörung auf (Rasmussen und Eisen, 1992; Graybiel und Rauch, 2000; Horwath und Weissman, 2000; Snider und Swedo, 2000; Friedlander und Desrocher, 2006). Des Weiteren sind diese Symptome enorm zeitintensiv, schwerwiegend und stigmatisierend. Als Folge sind die Betroffenen in ihrer sozialen, beruflichen und familiären Funktionalität stark eingeschränkt und unterliegen einem enormen persönlichen Leidensdruck, welcher demzufolge zu einer enormen Beeinträchtigung der Lebensqualität führt (Sibrava et al., 2011; Subramaniam et al., 2013). Als bestmögliche Behandlungsform gilt zum jetzigen Zeitpunkt eine Kombination aus Psychopharmakotherapie und Verhaltenstherapie (Romanelli et al., 2014), wobei diese oftmals dem chronischen Charakter der meist zu spät behandelten Erkrankung nicht ausreichend gerecht wird (Skoog und Skoog, 1999; Eisen et al., 2010).

Die Ätiologie der Zwangsstörung ist nicht gänzlich verstanden und unter Berücksichtigung der möglichen psychosozialen, neuroendokrinen, genetischen und neurobiologischen Faktoren wird bis zum jetzigen Zeitpunkt von einer multifaktoriellen Genese der Zwangsstörung ausgegangen (Stein, 2002; Bokor und Anderson, 2014).

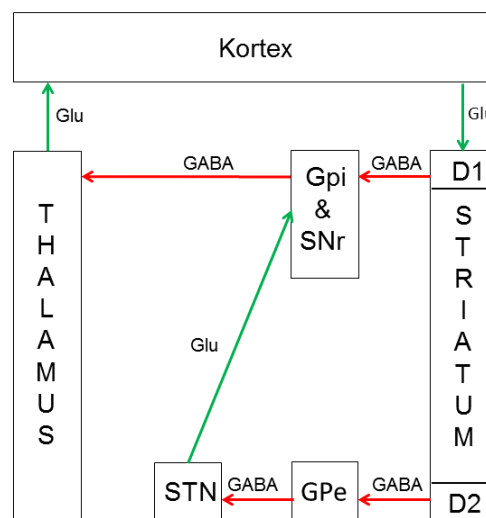
Unter diesen zeigen verschiedene Bildgebungsstudien mittels funktioneller Magnetresonanztomographie, Positronemissionstomographie oder Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie als neurobiologisches Erklärungsmodell Abnormitäten innerhalb bestimmter BGTC Schleifensysteme und deren modulierenden Neurotransmitter-Einheiten, welche als Erklärungsansätze zur Ätiologie dieser Erkrankung herangezogen werden können (Saxena et al., 1998, 2001; Saxena und Rauch, 2000; Maia et al., 2008; Rasmussen et al., 2013; Shaw et al., 2014).

## 1.3 Erklärungsansätze zur Ätiologie der Zwangsstörung

### 1.3.1 Neuroanatomisches Modell

Seit dem neurobiologischen Modell von Alexander und Crutcher (1990), nach dem die Basalganglien mit dem Thalamus und dem Kortex über mehrere parallel verlaufende Kreisläufe in sensomotorische, assoziative und limbische Prozesse eingebunden sind, wird nicht nur die pathophysiologische Ursache motorischer, sondern auch kognitiver und emotionaler Störungsbilder immer häufiger in einer Dysfunktion des BGTC Regelkreises gesehen (Diwadkar et al., 2014; Calderoni et al., 2014; Weber et al., 2014; Zhang et al., 2014). Als dominierendes Erklärungsmodell zur kortiko-striatalen-Dysfunktion der Zwangsstörung gilt immer noch das Konzept nach Saxena und Mitarbeitern (1998). Dieses postuliert als pathogenetische Ursache eine Dysregulation innerhalb des BGTC Kreislaufes mit beeinträchtigter thalamo-kortikaler Signalprozessierung bzw. beeinträchtigter Signalinhibition auf kortikalem Niveau (Saxena et al., 1998, 2001; Saxena und Rauch, 2000; Graybiel und Rauch, 2000; Maia et al., 2008; Del Casale, 2011).

Diese neurobiologische Hypothese gründet sich auf der Annahme eines dysbalancierten antagonistischen direkten und indirekten Wegs innerhalb der Basalganglien, der die Dysfunktion des BGTC Regelkreises bedingt (Abb.1.1).



**Abb. 1.1: Anatomisches Konzept der Basalganglien-thalamo-kortikalen Regelschleife unter physiologischen Bedingungen.**

rote Pfeile zeigen inhibitorische Projektionen und grüne Pfeile exzitatorische Projektionen an. D1 = D1-ähnliche Dopaminrezeptoren, D2 = D2-ähnliche Dopaminrezeptoren, GABA = Gamma-Aminobuttersäure; GPe = Globus pallidus externus, Gpi = Globus pallidus internus, Glu = Glutamat, SNr = Substantia nigra Pars reticulata, STN = Nucleus subthalamicus, VTA = ventrales tegmentales Areal. Adaptiert nach Maia et al., 2008.

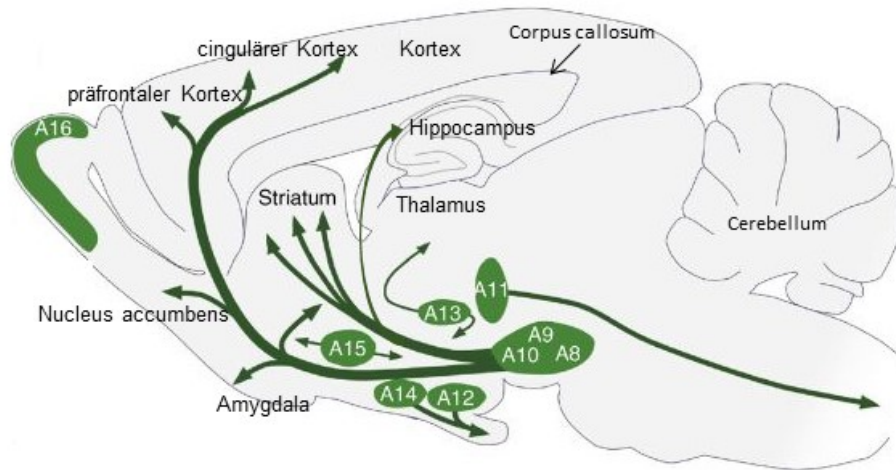
Nach diesem Konzept empfängt das Striatum als Haupteingangsstruktur der Basalganglien exzitatorische (glutamaterge) Afferenzen aus verschiedenen kortikalen Regionen. Von dort verläuft der direkte Weg über inhibitorische (GABAerge/Gamma-Aminobuttersäure) Projektionen unmittelbar zu den Basalganglien-Ausgangsstrukturen [Globus pallidus internus (GPi) und Substantia nigra Pars reticulata (SNr)], während der indirekte Weg über zwei hintereinandergeschaltete inhibitorische Bahnen des Globus pallidus externus (GPe) und des Nucleus subthalamicus (STN) zu den Basalganglien-Ausgangsstrukturen projiziert. Diese Strukturen kontrollieren über GABAerge Efferenzen die Aktivität des Thalamus, der die weitere glutamaterge Verbindung zum Kortex darstellt. Die kortikale Stimulation des direkten Weges führt folglich zu einer Desinhibierung und kortikalen Aktivierung, wohingegen die kortikale Stimulation des indirekten Weges eine Inhibierung und kortikale Suppression zur Folge hat. Ein Ungleichgewicht dieser Schaltkreise zugunsten des direkten Weges wird demnach für die Desinhibierung auf kortikalem Niveau und damit der Zwangssymptomatik verantwortlich gemacht.

Dieser Erklärungsansatz wird von vielen Bildgebungsstudien unterstützt, in denen sich Befunde zu Hyperaktivitäten des orbitofrontalen Kortex (OFC), des anterioren cingulären Kortex (ACC) sowie des Nucleus caudatus bei zwangsgestörten Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden fanden (Saxena et al., 1998; Graybiel und Rauch, 2000; Harrison et al., 2009; Bokor et al., 2014). Im Einzelnen ist der OFC an Prozessen der emotionalen Bewertung und einem angemessenen sozialen Verhalten beteiligt (Thorpe et al., 1983; Cummings, 1993; Rolls, 2004), während der ACC in Prozesse der Fehlerdetektion, der Entscheidungsfindung und der Problemlösung eingebunden ist (Korff und Harvey, 2006). Die Zielneurone dieser beiden präfrontalen Gehirnareale liegen wiederum im Nucleus caudatus, einem Teil der Basalganglien, welche gemeinsam mit dem Kortex und dem Thalamus an der Ausführung von geplantem und zielgerichtetem Verhalten beteiligt sind (Schwartz et al., 1996; Haber, 2003; Haber und Calzavara, 2009). Als Folge der gemeinsamen Aktivierung von Kortex und Nucleus caudatus und deren strukturellen Verschaltung über den direkten Weg könnte ein in sich geschlossenes System mit positiver Feedbackschleife gebildet werden, welches: (1) im ACC zu keiner befriedigenden Entscheidungsfindung führt (2) vom OFC emotional negativ bewertet wird und (3) über den Nucleus caudatus zu einer gestörten Planung zielgerichteten Verhaltens in Form der sich wiederholenden Störungsmuster resultiert (Graybiel und Rauch, 2000; Del Casale, 2011).

Mit dieser Annahme sind Ergebnisse neurochirurgischer Verfahren an therapierefraktären Zwangspatienten und validen Tiermodellen der Zwangsstörung kompatibel. Hierbei konnte durch gezielte Läsionen vornehmlich frontal-subkortikaler Projektionsbahnen, wie beispielsweise bei der anterioren Kapsulotomie und der Zingulotomie (Binder und Iskandar, 2000; van Kuyck et al., 2003; Lopes et al., 2004) eine signifikante Besserung der Symptomatik festgestellt werden. Überdies zeigten tierexperimentelle und klinische Studien in der Modulation dieses Netzwerkes mittels tiefer Hirnstimulation des inhibitorisch beteiligten subthalamischen Nucleus eine deutliche Symptomreduktion (Mallet et al., 2008; Winter et al., 2008a; Klavir et al., 2009; Chabardès et al., 2013) während die Läsion dieser subkortikalen Region in einer Symptominduktion resultierte (Winter et al., 2008b).

### **1.3.2 Neurochemisches Modell**

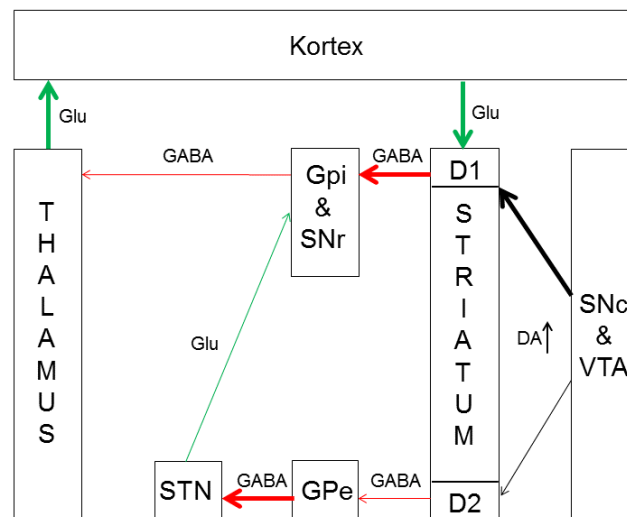
Auf neurochemischer Ebene wird vor allem eine Dysregulation im serotonergen System beschrieben. Diese Hypothese gründet primär auf neuropharmakologischen Studien, in denen eine hohe Wirksamkeit von trizyklischen Antidepressiva (z.B. Clomipramin) und selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRIs; z.B. Fluvoxamin, Citalopram) bei der Therapie der Zwangserkrankung dokumentiert ist (Pizarro et al., 2014). Bis zu 30 % der Patienten sind jedoch therapierefraktär (Husted und Shapira, 2004) und unter dem Aspekt eines dysfunktionalen BGTC Regelkreises sind neben Serotonin (5-HT) weitere modulierende Neurotransmitter dieses Systems wie Glutamat (Glu), GABA, Noradrenalin, Acetylcholin, Opioide und Dopamin mit der Zwangsstörung assoziiert worden (Goodman et al., 1990; Nikolaus et al., 2010; Bokor und Anderson, 2014; Kariuki-Nyuthe et al., 2014). In Anbetracht der Neurotransmitterverteilung innerhalb des BGTC Regelkreises kann das DAerge System mit seinen mesostriatalen, mesokortikalen und mesolimbischen Projektionsbahnen (Abb. 1.2) sowie einigen präklinischen Studien und der Pharmakotherapie der Zwangsstörung zufolge als besonders relevant angesehen werden (McDougle et al., 1994; Denys et al., 2004a, 2013; Björklund und Dunnett, 2007; Koo et al., 2010).



**Abb. 1.2: Schematische Abbildung der dopaminergen Projektionsbahnen.**

Topographie dopaminergener Neurone im adulten Rattengehirn (Sagittalschnitt) und deren primären Innervationsgebieten. Die dopaminergen Neurone werden hauptsächlich in den beiden Mittelhirnkernen, der Substantia nigra (A9) und dem ventralen tegmentalen Areal (A10), synthetisiert. Die Dopaminfreisetzung aus den Zellkörpern der Substantia nigra erfolgt hauptsächlich in die striatalen Projektionsbahnen (mesostriatales Projektionssystem). Die Dopaminfreisetzung aus den Zellkörpern der VTA erfolgt einerseits in die kortikalen Regionen des präfrontalen Kortex und des cingulären Kortex (mesokortikales Projektionssystem) sowie andererseits hauptsächlich in die Region des Nucleus accumbens und die Amygdala (mesolimbisches Projektionssystem). Die dopaminergen Neurone des Nucleus infundibularis (A12) projizieren zum hypophysären Pfortadersystem (tuberoinfundibuläres Projektionssystem). Adaptiert nach Björklund und Dunnett, 2007.

In Untersuchungen an validen Tiermodellen der Zwangsstörung sowie Zwangspatienten wird bei der zusätzlichen Gabe von DA-Antagonisten eine effektive Symptom-Reduzierung beobachtet (McDougale et al., 1994; Thomsen et al., 2004; Hoffman und Morales, 2012), während ein Überangebot an DA durch Psychostimulanzien bzw. DA-Agonisten die Symptomatik induzieren bzw. verstärken kann (Borcherding, 1990; Kouris, 1998; Eilam und Szechtman, 2005; Tucci et al., 2014). In Übereinstimmung mit diesen Befunden ist die Zwangsstörung mit einem Überangebot an nigro-striatalen DA und einem unmittelbaren Ungleichgewicht zugunsten des direkten Basalganglienweges assoziiert worden (Denys et al., 2004a; Koo et al., 2010; Karch und Pogarello, 2011/Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Anatomisches Konzept des Basalganglien-thalamo-kortikalen Regelkreises mit dopaminerger Innervation zugunsten des direkten Weges.**

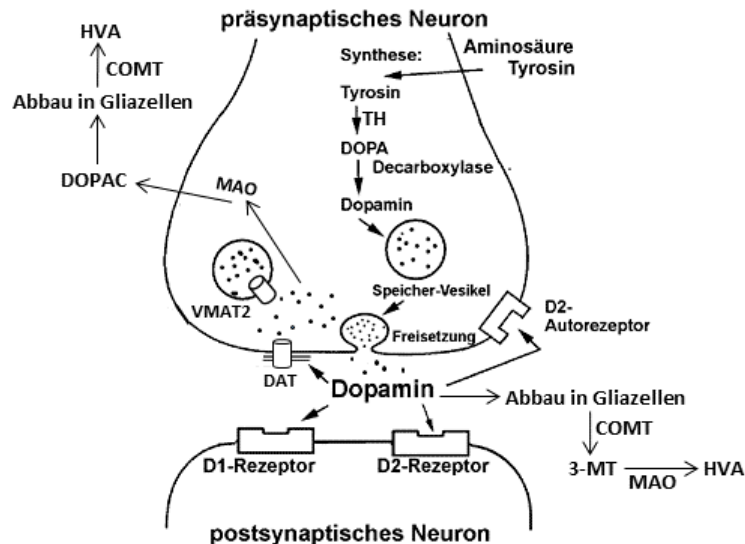
rote Pfeile zeigen inhibitorische Projektionen und grüne Pfeile exzitatorische Projektionen an. Dickere Pfeile zeigen eine verstärkte Projektion an und dünnere Pfeile eine verminderte Projektion. DA ↑ zeigt vermehrten Dopamin-Gehalt an. D1=D1-ähnliche Dopaminrezeptoren, D2=D2-ähnliche Dopaminrezeptoren, DA=Dopamin; GABA=Gamma-Aminobuttersäure; GPe=Globus pallidus externus, GPi=Globus pallidus internus, Glutamat=Glutamat; SNc=Substantia nigra Pars compacta, SNr=Substantia nigra Pars reticulata, STN=Nucleus subthalamicus, VTA=ventrales tegmentales Areal. Adaptiert nach Graybiel, 2000; Maia et al., 2008.

Die Regulation der Basalganglienaktivität erfolgt über die Bindung des nigro-striatalen DA an die Gruppe der Dopamin-ähnlichen D1- bzw. D2-Rezeptoren. Die D1-ähnlichen DA-Rezeptoren (Dopaminrezeptor: DRD1 und DRD5) sind vorwiegend an den striatalen Neuronen des direkten Weges exprimiert und wirken über ein stimulierendes G-Protein (Guaninnukleotid-bindend) aktivierend, während die D2-ähnlichen DA-Rezeptoren (Dopaminrezeptor: DRD2, DRD3 und DRD4) vorwiegend an den striatalen Neuronen des indirekten Weges exprimiert sind und über ein inhibitorisches G-Protein hemmend wirken (Alexander und Crutcher, 1990; Graybiel, 2000; Singer und Minzer, 2003). Ein Überangebot an nigro-striatalen DA unterstützt daher die Aktivität des direkten Weges, während dessen Abwesenheit die Aktivität des indirekten Weges begünstigt und infolge dessen zu einer Desinhibition der Kortexstrukturen und der Induktion zwanghaften Verhaltens führt. Andererseits können paradoxerweise auch DA-Agonisten nicht nur zwanghaftes Verhalten induzieren sondern auch reduzieren (Tibbo und Warneke, 1999). Dieser inkongruente Effekt erklärt sich bestmöglich mit der Modellvorstellung einer dynamischen phasisch/tonischen DA-Ausschüttung (Grace, 1993; Covey et al., 2013). Tonisches DA findet sich in niedriger Konzentration extrazellulär, reguliert die anhaltende Homöostase und unterliegt der Kontrolle

durch die D2-ähnlichen DA-Autorezeptoren (Gobert et al., 1995), wohingegen phasisches DA akut extrazellulär bei bestimmten Stimuli/physiologischen Veränderungen ausgeschüttet wird. Von dieser Annahme ausgehend könnte ein dauerhaft reduzierter tonischer DA-Spiegel kompensatorisch eine Sensitivierung und Hochregulation postsynaptischer DA-Rezeptoren einleiten, sodass eine akute Ausschüttung an phasischen DA bei Stress-Induktion über den direkten Weg verstärkte Effekte in Form der zwanghaften Verhaltensweisen bedingt (Grace, 1993).

#### **1.4 Dopaminerge Neurotransmission und pathophysiologische Hypothese**

In den dopaminergen Neuronen wird DA mittels des essentiellen Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH) synthetisiert und zunächst durch den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) in die präsynaptischen Vesikel aufgenommen und dort gespeichert (Vallone et al., 2000; Patel et al., 2003). Durch Calcium-abhängige Exozytose wird DA aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und dort über die präsynaptischen D2-ähnlichen DA-Autorezeptoren bzw. die D1- und D2-ähnlichen postsynaptischen DA-Rezeptoren gebunden (Vallone et al., 2000). Das extrazelluläre DA wird neben der Diffusion hauptsächlich über den Dopamintransporters (DAT) wieder aktiv in die Zelle aufgenommen (Giros und Caron, 1993). Das wieder aufgenommene DA wird in den DAergen Neuronen entweder mittels des VMAT2 wieder in die Vesikel verpackt und zur erneuten Ausschüttung bereitgestellt oder in der Präsynapse abgebaut. Das mitochondriale Enzym Monoaminoxidase (MAO) und das zytoplasmatische Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT) bilden für den Abbau die zwei Hauptenzyme. MAO metabolisiert zunächst das wiederaufgenommene DA zu 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC), welches anschließend mittels COMT extrazellulär zur Homovanillinsäure (HVA) umgesetzt wird. Neben diesen beiden Hauptabbauprodukten wird extrazelluläres DA in den umliegenden Gliazellen durch COMT zunächst zu 3-Methoxytyramin (3-MT) und anschließend über MAO ebenfalls zu HVA abgebaut (Aktories et al., 2005/Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Schematische Abbildung der dopaminergen Neurotransmission.**

In den dopaminergen Neuronen wird Dopamin (DA) mittels des essentiellen Enzyms Tyrosinhydroxylase (TH) synthetisiert und über den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) in die präsynaptischen Vesikel aufgenommen und dort gespeichert. Durch Calcium-abhängige Exozytose wird DA aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und dort über die präsynaptischen D2-ähnlichen Dopamin-Autorezeptoren bzw. die D1- und D2-ähnlichen postsynaptischen Dopaminrezeptoren gebunden. Das freigesetzte DA wird neben der Diffusion vor allem durch den Rücktransport des Dopamintransporters (DAT) wieder in die Zelle aufgenommen. Dieses DA wird in der Präsynapse entweder erneut mittels des VMAT2 in Vesikel transportiert oder mittels Monoaminoxidase (MAO) zu 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) und später über Catechol-O-Methyltransferase (COMT) zur Homovanillinsäure (HVA) abgebaut. In einem weiteren Stoffwechselweg wird das extrazelluläre DA über COMT zu 3-Methoxytyramin (3-MT) und anschließend über MAO zu HVA metabolisiert. Modifiziert nach Giros und Caron, 1993; Torres et al., 2003.

Die DAerge Neurotransmission hängt daher (1) von der Menge des Neurotransmitters selbst, (2) der freigesetzten Menge aus der Zelle mittels Exozytose, (3) der Bindungseigenschaften der präsynaptischen D2-ähnlichen-Autorezeptoren bzw. der postsynaptischen DA-Rezeptoren, (4) der funktionellen Responsivität der postsynaptischen Zelle und (5) dem Abbau bzw. Rücktransport des Neurotransmitters ab.

Ausgehend von dem Modell einer phasisch/tonischen DA-Ausschüttung mit verringertem tonischen- und erhöhtem phasischen DA-Level postulieren Singer und Minzer (2003) als entscheidende pathophysiologische Ursache repetitiver Störungen (Tourette-Syndrom) einen überaktiven DAT. Ein überaktives DAT-System kann demnach (1) die basale Konzentration tonischen DA reduzieren, (2) eine Sensitivierung und Hochregulierung der D2-ähnlichen DA-Rezeptoren bedingen, (3) die perisynaptische DA-Konzentration und somit die phasische Ausschüttung erhöhen und (4) zu einer verstärkten Signalweiterleitung an der Postsynapse führen.



Diese Hypothese stützend sind bei Patienten mit repetitiven Störungen, wie der Zwangsstörung oder dem Tourette-Syndrom, ähnliche Veränderungen auf den verschiedenen Ebenen des DA-Systems beschrieben. Wenngleich die Literatur nicht einheitlich ist, unterstützt sie dennoch die in dieser Arbeit aufgestellte pathophysiologische Hypothese eines überaktiven DAT. Genetische Assoziationsstudien dokumentieren einen Polymorphismus im DAT-Gen (Yoon et al., 2007; Taylor et al., 2013), während eine erhöhte DAT-Dichte mittels verschiedener Bildgebungsmethoden aufgezeigt ist (Müller-Vahl et al., 2000; Van der Wee et al., 2001; Kim et al., 2003; Cheon et al., 2004; Serra-Mestres et al., 2004; Liu et al., 2010). In biochemischen Untersuchungen zeigt sich für diese Erkrankungen zumeist ein insgesamt erniedrigter basaler DA-Spiegel (Cohen et al., 1978; Butler et al., 1979; Singer et al., 1982; Hollander et al., 1992, Zahn et al., 1996) mit wiederum erhöhten intrasynaptischen DA-Messwerten (Ernst et al., 1999; Singer et al., 2002; Wong et al., 2008). Darüber hinaus weisen weitere Bildgebungsstudien einen Anstieg in den Expressionsraten der DAergen Rezeptoren bei Patienten mit repetitiven Störungen nach (Wolf et al., 1996; Wong et al., 1997; Minzer et al., 2004; Wong et al., 2008).

Entsprechend dieser klinischen Befunde beschreiben Salahpour und Ghisi (2008, 2009) in ihrem DAT-überexprimierenden Mausmodell eine doppelt so hohe DA-Aufnahme, welche in einem 40 % verminderten extrazellulären DA-Spiegel resultiert und infolge dessen eine vorwiegende Hochregulierung der DRD2-Rezeptoren bedingt. Ferner zeigen diese Tiere nach DAerger Stimulation eine 3-fach erhöhte DA-Ausschüttung, welche mit einem verstärkten Kletterverhalten assoziiert ist. Darüber hinaus führt die Deaktivierung des DAT (DAT-KO) zu den gegenteiligen Effekten, mit einem erhöhten basalen DA-Level im Striatum, welcher eine verringerte DRD2-Rezeptor-Dichte und eine spontane Hyperaktivität zur Folge hat (Giros et al., 1996; Jones et al., 1998; Fauchey et al. 2000). Im Allgemeinen können die ersten Erkenntnisse an DAT-überexprimierenden Tieren die oben genannte ätiopathogenetische Hypothese eines überaktiven DAT-Systems bekräftigen und liefern somit ein neues, aber nicht hinreichend verifiziertes Konzept zum weiteren Verständnis der Pathophysiologie zwanghafter/repetitiver Störungen.

## 1.5 Pathologiemodelle der Studie

Vor dem Hintergrund einer phasisch/tonischen DA-Ausschüttung wurden in der vorliegenden Studie zwei Pathologiemodelle vergleichbarer DAerger Dysregulation unter Verwendung eines pharmakologischen und eines genetischen Ansatzes verwendet, welche vorab kurz erläutert werden sollen.

Auf der einen Seite beabsichtigte diese Arbeit in Kooperation eine transgene Rattenlinie mit Überexpression des DAT zu generieren, wodurch eine chronische Reduktion des tonischen DA und eine vermehrte Anreicherung des perisynaptischen (phasischen DA) bedingt werden sollte.

In Ergänzung zu diesem ersten Modell wurde für die vergleichenden Analysen das valide Tiermodell der Zwangsstörung nach Szechtman und Mitarbeiter (1998) herangezogen. In diesen Tieren sollte das phasisch/tonische DA modelliert werden, indem über die chronische Intervention mit dem DRD2/DRD3-Rezeptor-Agonisten Quinpirol (QNP) eine Reduktion des tonischen DA-Gehalts beabsichtigt wurde und die wiederholte Gabe an QNP akut phasische DA-Spitzen nachbilden sollte. Diese Versuchstiere zeigen auf dem Untersuchungsfeld ein zwanghaftes Kontrollverhalten, indem sie sich in den Dimensionen Zeit und Raum nur für kurze Zeit von einem präferierten Ort (home base) entfernen und diesen daher überzufällig häufig aufsuchen (Augenscheinvalidität). Dieses Verhalten kann wiederum durch die Gabe von Clomipramin abgeschwächt werden und besitzt demzufolge eine prädiktive Validität (Albelda und Joel, 2012).

In einem zweiten pharmakologischen Ansatz sollte in naiven Tieren mit physiologischen tonischen DA-Spiegel die akute Gabe desselben DA-Agonisten einen akuten Anstieg phasischen DA reflektieren und somit eine akute DA-Hyperaktivität widerspiegeln.

## 1.6 Zielsetzung der Studie

Die vorliegende Studie beabsichtigte, die Interaktion des BGTC Regelkreises und des DA-Systems in der Induktion zwanghafter/repetitiver Störungen zu untersuchen, indem ein dysregulatives DA-System innerhalb des BGTC Regelkreises als entscheidender Faktor überprüft werden sollte.

Hierfür sollten die dysfunktionalen Einheiten der einzelnen Kerngebiete des BGTC Regelkreises in den genannten Pathologiemodellen mit DAerger Dysregulation vergleichend untersucht werden.

- (1) Beide Pathologiemodelle sollten auf zwanghafte Verhaltensaspekte als primäres Krankheitsbild repetitiver Störungen im offenen Feld überprüft werden.
- (2) In beiden Pathologiemodellen sollten die DAergen Transporter (DAT, VMAT2) und DA-Rezeptoren (DRD1/DRD2) in den einzelnen Kerngebieten des BGTC Regelkreises mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) und Western-Blot (WB) quantifiziert werden.
- (3) Im transgenen Pathologiemodell sollten die relevanten Neurotransmitter der einzelnen Kerngebiete des BGTC Regelkreises mittels der Hochflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen werden.
- (4) Diese gewonnen Ergebnisse sollten mit den erhobenen Verhaltensaspekten beider Pathologiemodelle assoziiert werden.

Diese Erkenntnisse sollten zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen von zwanghaften/repetitiven Störungen beitragen um die Entwicklung von alternativen und ggf. effektiveren Therapiestrategien vorzubereiten. Folgende Fragestellungen galt es zu prüfen:

- (1) Kann eine Überexpression im DAT zwanghaftes/repetitives Verhalten induzieren und inwieweit sind die potentiellen biochemischen und molekularbiologischen Veränderungen in den transgenen Tieren mit den klinischen Befunden konsistent?
- (2) Inwiefern stimmen die potentiellen molekularbiologischen Veränderungen bei einer Induktion zwanghaften/repetitiven Verhaltens mittels chronischer QNP-Applikation mit den klinischen Befunden überein?
- (3) Unterliegen die beiden Pathologiemodelle denselben biochemischen und molekularbiologischen Veränderungen und welche Kernstruktur/en ist/sind hierunter in der Induktion zwanghafter/repetitiver Verhaltensweisen womöglich von besonderer pathophysiologischer Relevanz?

## 2. Material

Die benötigten Chemikalien (Tab. 2.1.), Fertiglösungen und Kits (Tab. 2.2), Antikörper und Genexpression Assays (Tab. 2.3), Lösungen (Lsg.) und Pufferansätze (Tab. 2.4), Geräte und Verbrauchsmaterialien (Tab. 2.5) sowie eingesetzte Software (Tab. 2.6) werden im Folgenden aufgeführt und im weiteren Verlauf nicht mehr näher beschrieben. Die Abkürzungen unter Tab. 2.4 beziehen sich jeweils auf die angewandte Methodik. FPT = Forced Proximity-Test; PCR = Polymerasekettenreaktion; TPA = TaqMan® Protein Expression Assay-Methode, WB = Western-Blot.

### 2.1 Chemikalien

**Tab. 2.1:** Liste der verwendeten Chemikalien.

Reagenzien	Hersteller
5-Hydroxyindolylelessigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acetonitril	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	Bioline, Massachusetts
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
ddH <sub>2</sub> O-Wasser	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
DOPAC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dopamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Folin-Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt
GABA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutamat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

→ Fortsetzung der Liste der verwendeten Chemikalien.

Reagenzien	Hersteller
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt
Homovanillinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopentan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen,
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumborat-Lösung (o-Phtalaldehyde Diluent OD 104)	Pickering Laboratories Inc, Mountain View
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Kresylviolett Acetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kupfersulfat	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat –Trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
octane-1-sulfonisch saures Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt
o-Phthaldialdehyd-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
o-Phtalaldehyd-Lösung OD 104	Pickering Laboratories Inc. Mountain
Pentobarbital	Merck KGaA, Darmstadt
Perchlorsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Quinpirol hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Serotonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

→ Fortsetzung der Liste der verwendeten Chemikalien.

Reagenzien	Hersteller
Taurin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween®-20	Serva, Heidelberg
Wasser (nuklease-frei; EmbryoMax®)	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## 2.2 Fertiglösungen und Kits

**Tab. 2.2:** Liste der verwendeten Fertiglösungen und Kits.

Reagenzien	Hersteller
Desoxyribonukleinsäure-Leiter 100 bp	New England BioLabs, Ipswich
Desoxyribonukleosidtriphosphat-Set (dNTP)-Set	Bioline, Berlin
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (No-Weigh™ Format)	Thermo Scientific, Rockford
High capacity RNA-to cDNA-Kit	Lifetechnologies, Foster City
NucleoSpin® RNA/Protein-Kit	Machery-Nagel, Düren
Phosphatase Inhibitorcocktail Set II	Merck KGaA, Darmstadt
Precision Plus Protein™ Kaleidoskope Standards	Bio-Rad, Hercules
Protease Inhibitorcocktail I	Merck KGaA, Darmstadt
Protein Quant Sample Lysis Kit	Lifetechnologies, Foster City
QIAquick Gel Extract Kit	Qiagen, Venlo
Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford
SuperBlock Blocking Buffer	Thermo Scientific, Rockford
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2x)	Lifetechnologies, Foster City
TaqMan® Protein Assays Buffer Kit	Lifetechnologies, Foster City
TaqMan® Protein Assays Core Reagents Base Kit	Lifetechnologies, Foster City
TaqMan® Protein Assays Fast Master Mix (2x)	Lifetechnologies, Foster City
TaqMan® Protein Assays Oligo Probe Kit	Lifetechnologies, Foster City
T-PER® Tissue Protein Extraction Reagent	Thermo Scientific, Rockford
Western Lightning Plus ECL	PerkinElmer, Waltham

## 2.3 Antikörper und Genexpression Assays

**Tab. 2.3:** Liste der verwendeten Antikörper und Genexpression Assays.

Reagenzien	Hersteller
D1DR (H-109)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas
D2DR (H-50)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas
D2DR (N-19)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas
Anti-Dopamin D <sub>2</sub> Receptor Rabbit pAb	Merck KGaA, Darmstadt
β-Actin Antikörper	Cell Signaling Technology, Danvers
DAT (H-80)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas
ECL Anti-rabbit IgG	Amersham, Buckinghamshire
Pierce® Streptavidin Poly-HRP	Thermo Scientific, Rockford
Rat monoclonal (hDAT-LOOP) to DAT	abcam, Cambridge
Rat monoclonal to Dopamin Transporter	abcam, Cambridge
SLC6A3 (human) Recombinant Protein (P01)	Abnova, Tapei
SLC6A3 rabbit polyklonal antibody (DO1P)	Abnova, Tapei
TaqMan® Gene Expression Assay (DAT) Rn00562224_m1/NM_012694.2	Lifetechnologies, Foster City
TaqMan® Gene Expression Assay (DRD1) Rn 03062203_s1/NM_012546.2	Lifetechnologies, Foster City
TaqMan® Gene Expression Assay (DRD2) Rn01418275_m1/NM012547.1	Lifetechnologies, Foster City
TaqMan® Gene Expression Assay (VMAT2) Rn00564688_m1/NM_013031.1	Lifetechnologies, Foster City
TaqMan® Gene Expression Assay (GFAP) Rn00566603_m1/NM_017009.2	Lifetechnologies, Foster City
VMAT 2 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas

## 2.4 Lösungen und Pufferansätze

**Tab. 2.4:** Liste der verwendeten Lösungen und Pufferansätze.

Reagenzien	Zusammensetzung
Acetatpuffer 20 mM	0,286 ml Essigsäure in 250 ml mit H <sub>2</sub> O; pH = 4.0
Agarose-Gel (2 %)	8 g auf 400 ml 1x TAE-Puffer
Assay-Reagenz (TPA)	6 µl Assay A, 6 µl Assay B, 108 µl Assay Probe Dilution Buffer
Blockierlösung (5 %)	25 ml PBST (1x), 1,25 g BSA
Coomassie-Entfärberlösung	40 ml Isopropanol, 10 ml Essigsäure; auf 100 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Coomassie-Färbelösung	20 ml Isopropanol, 5 ml Essigsäure, Spatelspitze Coomassie-Brillant-Blau; auf 50 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Derivatisierungslösung	10 mg o-Phthaldaldehyd: 0,2 ml Methanol, 1,8 ml o-Phthalaldehyd-Lösung OD 104, 20 µl β Mercaptoethanol
dNTP-Lösung (5 mM)	250 µl A, 250 µl C, 250 µl G, 250 µl T; auf 5 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Elektrophoresepuffer, (20x, PCR)	96,8 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan base (Tris), 27,2 Na-Acetat, 7,4 g EDTA; auf 1 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen; pH = 7,8
Elektrophoresepuffer (1x, WB)	25 mM Tris base, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS,
Eluent (A) Aminosäuren	6,804 g Natriumacetat-Trihydrat-Lösung, 375 µl Essigsäure, 50 ml Acetonitril; auf 1 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Eluent (B) Aminosäuren	850 ml Acetonitril, 150 ml H <sub>2</sub> O
Eluent Katecholamine	80 mM Natriumdihydrogenphosphat-Lösung: 0,85 mM octan-1-sulfonisch saure Salzlösung, 0,5 mM EDTA, 0,92 mM Phosphorsäure, 2-Iso-propanol (4 %)
Kresylviolett-Lösung (0,2 %)	0,5 g Kresylviolett Acetat in 250 ml 20 mM Acetatpuffer lösen



→ Fortsetzung der Liste der verwendeten Lösungen und Pufferansätze.

Reagenzien	Zusammensetzung
Ladepuffer (PCR)	4 g Sucrose und eine Spatelspitze Bromphenolblau in 10 ml TE lösen
Ladepuffer (WB)	0,25 M Tris HCl (ph = 6,8), 40 % Glycerol, 8 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau, 10 % $\beta$ -Mercaptoethanol
Ligationslösung (FPT)	50 $\mu$ l Ligation Reaction Buffer, 908 $\mu$ l H <sub>2</sub> O, 2 $\mu$ l Ligase (1:1)
Ligationslösung (TPA)	300 $\mu$ l Ligation Reaction Buffer, 5,454 ml H <sub>2</sub> O, 6 $\mu$ l Ligase (1:500)
„Lowry“-Reagenz	0,05 ml 1 % CuSO <sub>4</sub> -Lsg., 0,05 ml 2 % KNa-Tartat-Lsg., 5,0 ml 2 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lsg. (in 0,1 N NaOH-Lsg.)
Lysepuffer	2,5 ml 2M Tris base (ph = 8.5), 0,5 ml 5mM EDTA (ph = 8,0), 1 ml 10 % SDS, 2 ml 5M NaCl auf 50 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Mikroinjektionspuffer	8 mM Tris-HCl, 0,15 mM EDTA; pH = 7,4
PBST (1x)	1 l PBS (1x), 500 $\mu$ l Tween®-20
PCR-Puffer (10x)	500 mM KCl, 1000 mM Tris HCl (ph = 9.0)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS 1x)	8 g NaCl, 0,5 g KCl, 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; auf 1 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Ponceau-Färbelösung	0,125 g Ponceau S, 500 $\mu$ l Essigsäure; auf 50 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Protease-Lösung	1 $\mu$ l Protease, 99 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
Proteinase K-Lösung	10 mg auf 1 ml H <sub>2</sub> O auffüllen
Prox-Oligo-Lösung (FPT)	5 $\mu$ l 200nm Prox-Oligo-3'-Lsg. 5 $\mu$ l 200nm Prox-Oligo-5'-Lsg
RNase A-Lösung	4 mg auf 1 ml H <sub>2</sub> O auffüllen

→ Fortsetzung der Liste der verwendeten Lösungen und Pufferansätze.

Reagenzien	Zusammensetzung
SDS Sammelgel (10 %)	0,325 ml Rotiphorese® Gel 30, 0,625 ml Tris-Lsg. (0,5 M, ph = 6.8), 1,525 ml H <sub>2</sub> O, 25 µl SDS-Lsg. (10 %), 15 µl APS-Lösung (10 %), 2,5 µl TEMED
SDS Trenngel (10 %)	2,5 ml Rotiphorese® Gel 30, 1,875 ml Tris-Lsg. (1,5 M, ph = 8,7), 3,125 ml H <sub>2</sub> O, 75 ml 10 % SDS-Lsg., 40 µl APS-Lösung (10 %), 7,5 ml TEMED
Standardlösung (Aminosäure)	5 µM Glu, 5 µM Gln, 5 µM Taurin, 2 µM GABA (jeweils in H <sub>2</sub> O)
Standardlösung (Katecholamine)	0,1 µM DOPAC, 0,1 µM HVA, 0,1 µM 3-MT, 1 µM DA (jeweils in 0,1 M Perchlorsäure); 0,1 µM 5-HT, 0,1 µM 5-HIAA (jeweils in H <sub>2</sub> O)
TAE-Puffer (50x)	484 g Tris base, 136 g Na-Acetat, 37 g EDTA; ph = 7,8; auf 2 Liter mit Eisessig auffüllen
TE-Puffer (10x)	50 ml 2 M Tris base (ph = 7,4), 20 ml 0,5 M EDTA-Lsg., auf 1 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Transferpuffer (1x)	48 mM Tris base, 39 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,04 % SDS

## 2.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2.5:** Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Geräte	Hersteller
Autoinjektor 231XL+Dilutor 401 C	Gilson, Middleton
Blotkammer (Trans-Blot® SD)	Bio-Rad, München
Blot-Papier	Bio-Rad, München
Deckgläser (24 x 40mm) Menzel-Gläser	Thermo Scientific, Rockford
Einweg-Homogenisatoren	Biolap Programm GmbH
Elektrochemischer Detektor 41000	Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, München

→ Fortsetzung der Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Geräte	Hersteller
Elektrophoresekammer (Southern Blot, easyPhor Mini)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Elektrophoresekammer (Western Blot)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Filter-Tips (premium 0.1-10µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Filter Tips (Biosphere 20µl/200µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Fluoreszenzdetektor (CMA/280)	CMA Mikrodialysis AB, Kista
Glaswaren	Schott Glas, Mainz
Heizblock (Thriller)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kolonnenthermostat (Aminosäuren) jetstream	VDS-optilab, Berlin
Kolonnenthermostat (Katecholamine) RM6	LAUDA, Lauda-Königshofen
Kühlplatte	StörkTronic, Stuttgart
Kühlzentrifuge (4K10)	Sigma, Osterode am Harz
Kryostat 1800,	Reichert-Jung; Heidelberg
Lichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
MicroAmp® Fast Optical 48-well Reaction Plate	Lifetechnologies, Foster City
MicroAmp® Optical 8-Cap Strip	Lifetechnologies, Foster City
MicroAmp® Reaction Röhrchen with cap (0.2ml)	Lifetechnologies, Foster City
Objektträger (SuperFrost®Plus) Menzel-Gläser	Thermo Scientific, Rockford
OP-Besteck	Braun, Melsungen
pH-Meter	Knick, Berlin
Power Pac 200	Bio-Rad, München
Präzisionswaage (ALS 120-4N)	Kern und Sohn GmbH, Balingen- Frommern
Probengeber 231 XL	Gilson, Middleton
Pumpe (Aminosäure) L-6200A/L-6000	Merck-Hitachi, Tokio
Pumpe (Aminosäuren) RHEOS 4000	Flux Instruments AG, ReiNach
Pumpe (Katecholamine) LC-10AD	Schimidzu, Kyoto
Pumpe (Katecholamine) 300C	GynkoteK, Germering
Reaktionsgefäße (0,2 /1,5/ 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Säule Katecholamine (ProntoSil 120-3-C18-SH)	Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH, Leonberg

→ Fortsetzung der Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Säule Aminosäuren (Applichrom® OTU Trikala C18)	Application and Chromatography, Oranienburg
Scanner Axon 4000B	Axon Technologies, Union City, USA
Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units	Thermo Scientific, Rockford
Southern-Blot Dokumentationsanlage(AlphaImager HP)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Spektrophotometer (Spekol11)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
StepOne Real-Time PCR System	Lifetechnologies, Foster City
Thermozykler 2720	Lifetechnologies, Foster City
Tischzentrifuge (mini-spin)	Eppendorf, Hamburg
Transfermembran (Roti®-PVDF)	Roth, Karlsruhe
Ultraschallhomogenisator (vibra-Cell™)	Sonics & Materials Inc., Newton
Umlaufkühler FC 200	JULABO, Seelbach
UV-Vis-Spektrophotometer (ND-1000)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vorsäule Aminosäuren (Prontosil 120-5-C18 SH)	Bischoff Analysentechnik und -geräte GmbH, Leonberg
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia, USA
Webcam (HD-300)	Microsoft, Redmond
Zentrifuge (LMC-3000)	Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen, Wien

## 2.6 Software

**Tab. 2.6:** Liste der verwendeten Software.

Software	Hersteller
Clarity (2.3.0.163/ Katecholamine)	DataApex Ltd, Prag, Tschechische Republik
Clarity (2.6.5.5.517/Aminosäuren)	DataApex Ltd, Prag, Tschechische Republik
DataAssist™ Software v2.0	Lifetechnologies, Foster City
EthoVision XT 8.5	Noldus Technology, Wageningen
Microsoft Office	Microsoft, Redmond
ProteinAssist™ Software v2.0	Lifetechnologies, Foster City
SigmaPlot 13.0	Systat Software GmbH, Erkrath

## 2.7 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden für die beiden Pathologiemodelle unterschiedliche Rattenlinien verwendet. Die Generierung der transgenen Linie erfolgte aus Sprague-Dawley (SD)-Hannover-Ratten (Auszuchtstamm, Janvier Labs, Le Genest St. Isle, Frankreich) und die Phänotypinduzierung des pharmakologischen Pathologiemodells an naiven männlichen Wistar-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland).

Die Zucht und Haltung der Tiere fand entsprechend den Richtlinien für Labortiere des europäischen Parlaments und des Rates vom 22 September 2010 (2010/63/EU) mit der Zustimmung des lokalen Ethikkomitees (Berliner Senat) bei Temperatur- (+/- 22 °C) und Feuchtigkeits- (40 % - 70 %) kontrollierten Bedingungen unter einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus (Lichtphase von 6:00 Uhr bis 18.00 Uhr) statt, während Futter (Altromin, Lage, Deutschland) sowie Wasser *ad libitum* verfügbar waren. In Übereinstimmung mit den Haltungs-Richtlinien wurden für die transgene Linie die Bedingungen der Sicherheitsstufe 1 sowie eine individuell-ventilierte Käfighaltung berücksichtigt.

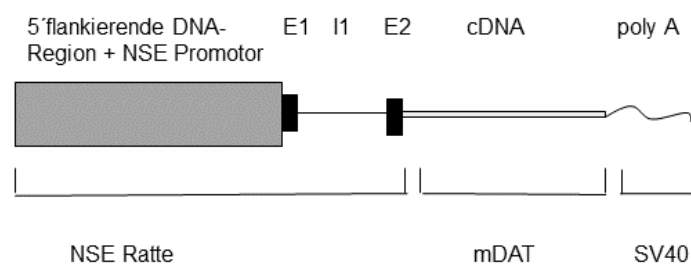
### 3. Methoden

#### 3.1 Generierung und erste Charakterisierung der transgenen Tiere

##### 3.1.1 Konstruktgenerierung und klassische Mikroinjektion

Die klassisch transgenen Tiere wurden in Kooperation mit Fr. Prof. Dr. I. Puls, Campus Charité Mitte, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Abteilung Genetik und Hr. Prof. Dr. M. Bader, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch, Abteilung molekulare Biologie der Peptid-Hormone, generiert. Für die Generierung der DAT überexprimierenden Ratten wurde *in vitro* ein Implementationskonstrukt im Labor von Fr. Prof. Dr. I. Puls generiert. Hierbei wurde die volle Kodierungsregion der komplementären Desoxyribonukleinsäure des *murinen* DAT (mDAT cDNA; ~ 1,8 kb) in die Restriktionsendonuklease-Stelle *EcoRI* der multiplen Klonierungsstelle des pcDNA3-Vektors (Lifetechnologies, Foster City) subkloniert (Brüsseet al., 1999). Dieses Konstrukt substituierte dann mittels Restriktionsverdau und konsekutiver Ligation das durch die Restriktionsendonukleasen *SAL1* und *HINDIII* umschriebene Teilstück (~ 2,8 kb) des neuronenspezifischen Enolase-Exon4-Expressionsvektors (pNSE-Ex4, Bader, Berlin-Buch) als zentral nervöses Modell.

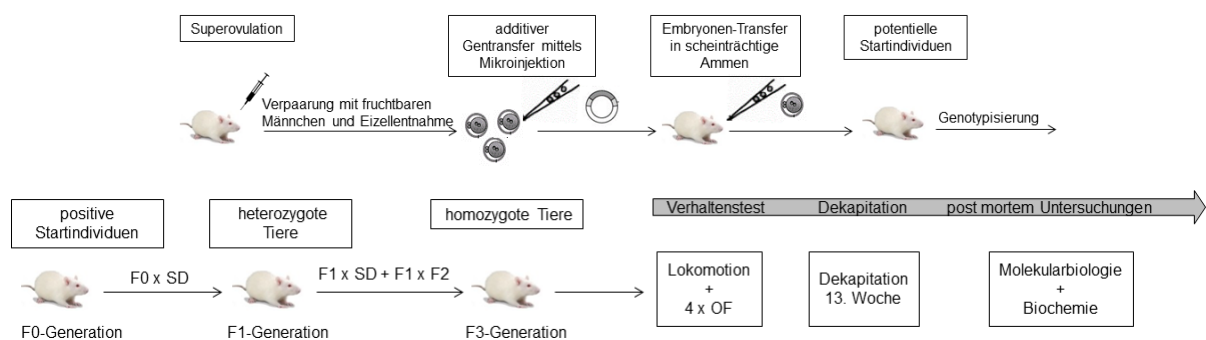
Aus diesem Expressionsvektor wurde ein 4 kb langes DNA-Fragment (Abb. 3.1), welches die mDAT cDNA unter der Kontrolle des NSE-Promotors enthält, mittels Restriktionsverdau (*NruI*, *NaeI*) separiert und mit Hilfe des QIAquick Gel Extract Kit extrahiert. Dieses DNA-Fragment wurde mit 3 µg/µl Mikroinjektions-Puffer versetzt und für die später Mikroinjektion bei - 80° C aufbewahrt.



**Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Injektionskonstruktes.**

cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure; E1 = Exon 1, E2 = Exon 2 (6 bp); I1 = Intron 1; mDAT = *murine* Dopamintransportersequenz; NSE = neuronenspezifische Enolase-Sequenz; poly A = Polyadenylierungs-Schwanz; SV-40 = *Simian-Virus* 40.

Die anschließende Mikroinjektion des transgenen Konstruktes als klassisch transgenes Modell wurde nach der Methodik von Popova und Mitarbeitern (2005) im Labor von Hr. Prof. Dr. M. Bader durchgeführt (Abb. 3.2). Für die Eizellgewinnung wurde im ersten Schritt eine Superovulation weiblicher Ratten durch intraperitoneale (i.p.) Injektion zweier Gestagene (follikelstimulierendes Hormon = FSH; humanes Choriongonadotropin = hCG) innerhalb von 48 Stunden initiiert. Diese weiblichen Tiere wurden mit naiven Männchen verpaart und die befruchteten Oozyten aus dem Eileiter an diesen durch Genickdislokation getöteten Weibchen entnommen. Die Mikroinjektion des transgenen Konstruktes (3-5 ng/ $\mu$ l) erfolgte am Pronukleus der Zygoten und der Embryonen-Transfer wurde am selben Tag in den Ovidukt scheinträchtiger narkotisierter Ammen vorgenommen. Die aus den transgenen Donorzellen entstandenen potentiellen Startindividuen (F0-Generation) sowie alle weiteren Nachkommen dieser Linie wurden auf die Integration des Transgens mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien untersucht. Die Nachkommen dieser Linie wurden jeweils im Alter von 4 Wochen abgesetzt, zur Identifizierung mit einer numerischen Ohrlochung versehen und getrennt nach Geschlecht gehalten. Für die Zucht einer homozygoten Linie wurden positiv getestete Startindividuen zunächst mit Wildtyp-Sprague Dawley (SD) Tieren gekreuzt, die heterozygoten Nachkommen der Folgegenerationen 1 und 2 (F1 und F2) untereinander verpaart und somit erste homozygote Tiere in der F3-Generation erzeugt, welche für die weitere rein homozygote Zucht-(Erhaltung) herangezogen wurden (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Generierung des transgenen Pathologiemodells mittels Mikroinjektion.**

Die Superovulation der weiblichen Tiere erfolgte mittels intraperitonealer Injektion zweier Gestagene. Nach anschließender Verpaarung wurden die befruchteten Eizellen aus dem Ovidukt der Donormütter entnommen und der Gentransfer an dem Pronukleus dieser Zygoten vorgenommen. Diese Embryonen wurden in den Ovidukt scheinträchtiger Ammen verbracht, wodurch potentielle Startindividuen (F0-Generation) hervorgingen. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien. Für die Zucht einer homozygoten Linie wurden positiv getestete Startindividuen zunächst mit Wildtyp-Sprague-Dawley (SD) Tieren gekreuzt, die heterozygoten Nachkommen der Folgegenerationen 1 und 2 (F1 und F2) untereinander verpaart und somit erste homozygote Tiere in der F3-Generation erzeugt, welche für die weitere rein homozygote Zucht-(Erhaltung) herangezogen wurden.

### 3.1.2 Genotypisierung

#### 3.1.2.1 Isolierung der genomischen DNA

Die Genotypisierung der transgenen Tiere erfolgte ebenfalls in Kooperation im Labor von Hr. Prof. M. Bader anhand von Schwanzbiopsien nach dem Absetzen der Tiere (postnataler Tag 28). Zur Isolierung der genomischen DNA wurde ein kleiner Teil der Schwanzspitze mit 90 µl Lysepuffer und 10 µl Proteinase K-Lösung bei 55 °C über Nacht schüttelnd inkubiert. Die Proteinase K dieses Ansatzes, aus komplett verdautem Gewebe, wurde am nächsten Tag bei 95 °C für 10 min. inaktiviert und mit 750 µl 1x TE-Ribonuklease (RNase)-Puffer inaktiviert. Diese Gewebeproben wurden für die weitere PCR-Analyse zunächst bei -20 °C gelagert.

#### 3.1.2.2 PCR-Analysen und Agarose-Gelelektrophorese

Die *in vitro* Amplifizierung der DNA-Fragmente (Punkt 3.1.2.1) erfolgte unter Anwendung der folgenden Primer (Tab. 3.1 A) im Thermozykler nach in Tab. 3.1 B und Tab. 3.1 C aufgezeigtem Schema.

**Tab. 3.1 A:** Primer und Sequenzen der PCR-Analysen.

Primer	Sequenz
NSEf (vorwärts)	CTTCTACAGTGTCTGATTGC
DATr (rückwärts)	CCTTGACCAAGATGAGCTC

**Tab. 3.1 B:** Pipettierschema für 10 Reaktionen der PCR.

Menge	Reagenzien
27,5 µl	PCR-Puffer (1x)
11 µl	dNTP (0,2 mM)
11 µl	MgCl <sub>2</sub> (2 mM)
5,5 µl	NSEF Primer (0,14 µM)
5,5 µl	DATR Primer (0,14 µM)
2,2 µl	Taq Polymerase (1x/Eigenherstellung)
201,3 µl	dH <sub>2</sub> O
1 µl	DNA



**Tab. 3.1 C:** Thermozykler-Programm für die PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min.	1x
Denaturierung	95 °C	30 sec.	34x
Primer-Hybridisierung	58,7 °C	30 sec.	34x
Elongation	72 °C	1 min.	34x
finale Elongation	72 °C	10 min.	1x
Kühlung	4 °C	10 min.	∞

In direktem Anschluss an die PCR wurden zunächst 25 µl der Amplifikationsprodukte mit 5 µl DNA-Ladepuffer versetzt und jeweils 15 µl dieser Lösung auf ein 2 %iges Agarosegel, welches zur Visualisierung der DNA mit 1 %igen Ethidiumbromid versetzt wurde, aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden bei 110 Volt für 10 min. mittels des 1x TAE-Elektrophoresepuffers elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation der Elektrophorese erfolgte unter Ultravioletten-Licht an der AlphaImager HP Geldokumentationsanlage und unter Verwendung des 100 bp DNA-Größenstandards.

### 3.1.3 Allgemeine Charakterisierung

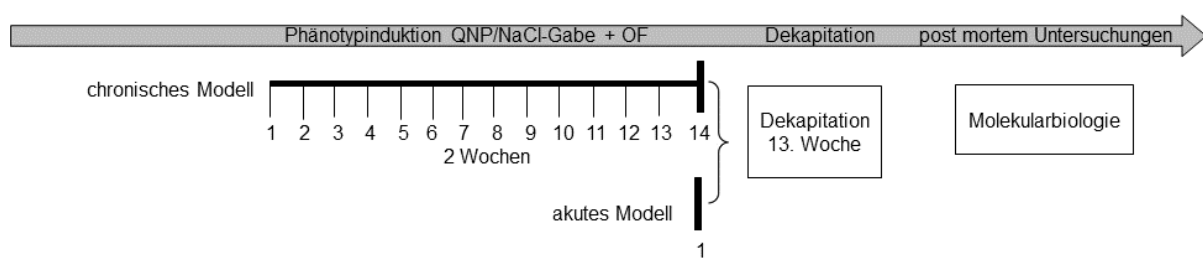
Im Zuge der vorgeschriebenen Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien nach Anlage 4 des Landesamts für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) des Tierschutzgesetzes vom 13.07.2013 fielen die Tiere vor allem in Bezug auf ihren Ernährungszustand und ihre Inaktivität auf. Da diese Aspekte zu einer Fehlinterpretation in dem späteren Verhaltensversuch führen könnten wurden diese Parameter zunächst genauer erfasst. Der Ernährungszustand wurde anhand des jeweiligen Körpergewichts einmalig zu Versuchsbeginn und die Futterkonsumption über einen Bemessungszeitraum von 5 Tagen bei Einzelhaltung über die Menge des pelletierten Futters nach je 24 beurteilt. Die Analyse der Bewegungsaktivität erfolgte nach einem standardisierten Verfahren (Meyer et al., 2005), zu dem die Versuchstiere an zwei nicht aufeinanderfolgenden Testtagen für jeweils 10 min. auf ein offenes Feld in den Maßen von 100 x 100 x 20 cm gesetzt wurden. Die lokomotorische Aktivität wurde mittels einer Webcam video-aufgezeichnet und die zurückgelegte Gesamtstrecke mittels der Software EthoVision XT analysiert. Des Weiteren erfolgten neben dieser

Dokumentation ein umfassendes Kleintierscreening sowie eine morphologische in Augenscheinnahme der Organe von Seiten einer Veterinärmedizinerin.

### 3.2 Phänotyp-Induktion des pharmakologischen Pathologiemodells

Alle Versuchstiere hatten zunächst eine Eingewöhungsphase von einer Woche und wurden drei Tage vor Versuchsbeginn für jeweils 2 Minuten an den Umgang mit der versuchsdurchführenden Person gewöhnt. Mit Untersuchungsbeginn (Testlauf 1) wurde den Tieren 0,5 mg/kg Körpergewicht QNP [0,5 mg/ml; Verdünnung mit 0,9 % Natriumchlorid (NaCl)] oder die gleiche Menge an einer 0,9 % NaCl-Lösung (Kontrolltiere) subkutan in die Nackenfalte injiziert. Die Versuchstiere wurden für die Induktion des jeweiligen Phänotyps in folgende zwei Gruppen unterteilt (Abb. 3.3)

- (1) Die chronisch intermittierende Gruppe erhielt 2-mal pro Woche, mit einer Unterbrechung von 2-3 Tagen zwischen den Testläufen, entweder eine QNP- (n = 10) oder eine NaCl-Lösung (n = 10) mit anschließendem kontinuierlichem Training auf dem offenen Feld (Punkt 3.3) über einen Zeitraum von insgesamt sieben Wochen und anschließender Dekapitation für die *post mortem* Untersuchungen.
- (2) Die akute Gruppe erhielt einmalig entweder eine QNP- (n = 10) oder eine NaCl-Lösung (n = 10) appliziert mit anschließender einmaliger Verhaltensbeobachtung auf dem offenen Feld (Punkt 3.3) und direkter Dekapitation für die weiteren *post mortem* Untersuchungen.

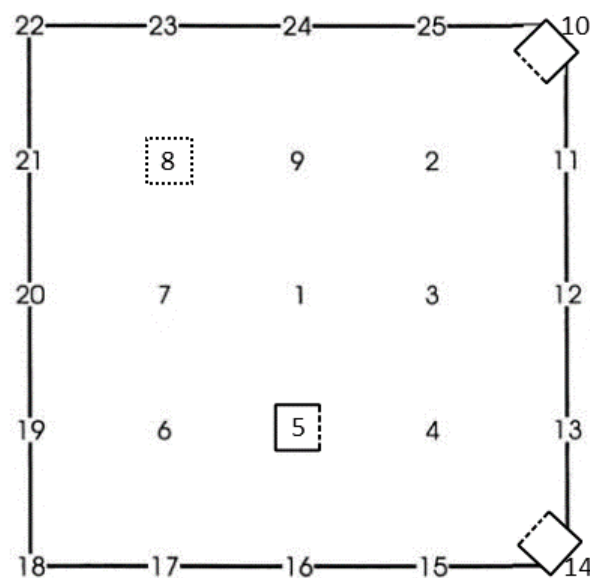


**Abb. 3.3: Phänotypinduzierung des pharmakologischen Pathologiemodells.**

Die zwei Versuchsgruppen von je n = 20 Tieren waren unterteilt in: (1) eine chronische Gruppe, welche 2-mal pro Woche, mit einer Unterbrechung von 2-3 Tagen zwischen den Testläufen entweder eine Quinpirol (QNP)-Lösung (0,5mg/kg Körpergewicht; n = 10) oder eine Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (0,5mg/kg/Körpergewicht; n = 10) mit anschließendem kontinuierlichem Training auf dem offenen Feld (OF) über einen Zeitraum von insgesamt sieben Wochen erhielt und (2) eine akute Gruppe, denen einmalig entweder eine QNP- (n = 10) oder eine NaCl-Lösung (n = 10) appliziert wurde mit anschließender einmaliger Verhaltensbeobachtung auf dem offenen Feld.

### 3.3 Zwanghaftes Kontrollverhalten auf dem offenen Feld

Die Versuchsdurchführung in Bezug auf ein zwanghaftes Kontrollverhalten als eines der häufigsten Symptome der Zwangsstörung (Rasmussen und Eisen, 1992) erfolgte für beide Pathologiemodelle nach dem Modell von Szechtman und Mitarbeitern (1989). Das modifizierte offene Feld bestand aus einer Glasplatte (140 x 140 x 20 cm) mit einem Abstand von 20 cm zu den Wänden. Die Glasplatte war in 25 zueinander symmetrischen Subarealen unterteilt von denen auf vier dieser Subareale Plexiglasboxen (8 x 8 x 8 cm) mit je einer offenen Seite verbracht waren. Alle übrigen Subareale bildeten schwarze, 3 x 3 cm große Quadrate, mit einem Abstand von circa 40 cm zueinander, um eine bessere Definition des Bewegungsmusters zu gewährleisten (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4: Schematische Darstellung des modifizierten offenen Feldes.**

Auf der Plattform befanden sich 25 Subareale (Nummer 1-25) als schwarze Quadrate in gleichem Abstand zueinander. Auf vier dieser Quadrate (5, 8, 10, 14) wurden Plexiglasboxen an definierten Stellen fixiert, welche zu unterschiedlichen Seiten offen gestaltet waren (gestrichelte Linie). Die Plexiglasbox der Position 8 war nach oben offen gestaltet. Adaptiert nach Szechtman et al., 1998.

Die Versuchstiere beider Pathologiemodelle wurden in einer pseudo-randomisierten Reihenfolge auf das modifizierte offene Feld gesetzt und das Verhalten der Tiere für 30 Minuten pro Testlauf kontinuierlich kamera-überwacht. Die Exposition der pharmakologischen Tiere erfolgte jeweils 15 Minuten nach der jeweiligen QNP- bzw. Kochsalz-Applikation, während ein möglicherweise angeborenes Zwangsverhalten der transgenen Tiere über insgesamt vier intermittierende Versuchstage ohne jegliche Substanzapplikation überprüft wurde. Im Hinblick auf die Augenschein-Validität für ein

zwanghaftes Kontrollverhalten sind folgende Kriterien beschrieben: Das Tier kehrt innerhalb seines Territoriums zu einem oder zwei Arealen (home base) besonders häufig und besonders schnell zurück und besucht die anderen Areale auf dem offenen Feld insgesamt bedeutend seltener, ehe es zu dem bevorzugten Areal zurückkehrt (Szechtman, et al., 1998, 2001; Eilam und Szechtman, 2005).

Demzufolge konnten folgende Parameter für jedes einzelne Tier und jeden einzelnen Testlauf dokumentiert werden.

- (1) Totale Anzahl an home base-Besuchen
- (2) Durchschnittliche Rückkehrzeit zur home base
- (3) Durchschnittliche Anzahl an anderen Subarealen, bevor die home base erneut aufgesucht wurde. Hierfür wurde die Anzahl aller aufgesuchten Subareale durch die Anzahl der home base-Besuche dividiert.

Da allerdings die wiederholte Gabe an QNP auch eine vermehrte Lokomotion zur Folge hat (Szechtman et al., 1994; Szumlinski et al., 1997) und zwanghaftes Kontrollverhalten Lokomotion bedingt, wurde für das pharmakologische Tiermodell ein zusätzlicher Parameter miteinbezogen, welcher eine ungefähre Abschätzung in der Veränderung des Kontrollverhaltens unabhängig von den lokomotorischen Veränderungen zuließ.

Im Speziellen bedeutete dies:

- (4) Die Quote von beobachteten zu erwarteten home base-Besuchen ( $R_{\text{beobachtete/erwartete}}$ ) wurde errechnet, indem die Anzahl der Besuche an der home base ( $V_{\text{hb}}$ ) in Bezug auf die Gesamtzahl aller Subareale ( $V_{\text{total}}$ ) über die Anzahl der von dem Versuchstier aufgesuchten Subareale ( $V_{\text{Subareal}}$ ) normalisiert wurde (Mundt et al., 2009):

$$R_{\text{beobachtete/erwartete}} = \frac{V_{\text{hb}} \times V_{\text{Subareal}}}{V_{\text{total}}}$$

### 3.4 *Post mortem* Gewebe-Präparation

Für die *post mortem* Analysen wurde den Ratten eine finale Dosis des Narkosemittels Pentobarbital intraperitoneal gespritzt und die Tiefe der Narkosewirkung über den Stell- und Schwanz-Reflex überprüft. Nach der zervikalen Dekapitation der Tiere mittels einer Guillotine wurden die Gehirne entnommen, für zwei Minuten in -30 °C kalten Isopentan schockgefroren und anschließend 0,5-1 mm dicke koronale Gehirnscheiben mit Hilfe eines Kryostaten nach den Koordinaten gemäß Bregma angefertigt. Die Orientierung der einzelnen

Gehirnscheiben wurde an 20 µm dicken Gehirnschnitten kontrolliert, welche jeweils vor und nach den eigentlichen Gehirnscheiben aufgenommen, mit Kresylechtviolett (Nissl) angefärbt und lichtmikroskopisch gemäß Paxinos und Watson (1998) überprüft wurden. Im letzten Schritt wurden von diesen gefrorenen Gehirnscheiben die einzelnen Gewebeproben (Tab. 3.2) anhand eines speziellen Stanzgerätes (1 mm Durchmesser) und einer Kühlplatte (- 22 °C) gewonnen, umgehend in die jeweiligen Pufferlösungen verbracht, mittels Ultraschall homogenisiert und für die weiteren Bestimmungen bei - 80 °C aufbewahrt.

**Tab. 3.2:** Liste der *post mortem* Gehirnscheiben und Gewebestanzungen nach Bregma.

Bregma	Region
+3,2 bis +2,2	-cingulärer Kortex, Areal 1 (CG1) -prälimbischer Kortex (PrL) -infralimbischer Kortex (IL) -ventraler orbitaler Kortex (VO) -lateral orbitaler Kortex (LO)
+1,6 bis +0,6	-Nucleus accumbens (NAc: Kern-und Randgebiet)
+0,6 bis -0,4	-Caudatus-Putamen (CPu: Nucleus caudatus und Putamen)
-0,8 bis -1,3	-lateraler Globus pallidus (LGP = Gpe: entspricht externen Teil des Globus pallidus)
-2,1 bis -3,1	-Hippocampus (HPC: Bereich von Cornu Ammonis Region 1 und Gyrus dentatus) -dorsomedialer Thalamus (DM) -medialer Globus pallidus (MGP = Gpi: entspricht internen Teil des Globus pallidus)
-3,6 bis -4,1	-Nucleus subthalamicus (STN)
-4,8 bis -5,8	-Substantia nigra (SN)/ventrales tegmentales Areal (VTA)

### 3.5 Quantitative PCR-Analysen

#### 3.5.1 Isolierung der Gesamt-RNA und cDNA-Synthese

Die Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) wurde nach den Herstellerangaben und den Reagenzien des NucleoSpin® RNA/Protein-Kit aus folgenden Arealen des unter Punkt 3.4 präparierten Gewebematerials beider Tiermodelle isoliert: medialer präfrontaler Kortex (mPFC) (getrennt in: CG1 + PrL + IL), orbitofrontaler Kortex (OFC) (getrennt in: VO + LO), NAc, CPu, GP (getrennt in: LGP + MGP), HPC, DM, STN sowie SN/VTA. Die Gesamt-RNA des

pharmakologischen Modells wurde dabei jeweils aus beiden Hemisphären gewonnen, während für die transgene Linie nur die Gesamt-RNA je einer Gehirnhälfte isoliert wurde. Zusätzlich wurden zur Überprüfung der zentralnervösen DAT-Überexpression die Gesamt-RNA aus Gewebeproben der Leber, der Nebenniere, der Lunge, des Herzens und der Gonaden eines männlichen homozygoten Tieres isoliert.

Jede Probe wurde mit 350 µl RP1-Puffer versetzt, mittels Ultraschall homogenisiert, auf einen NucleoSpin® Filter verbracht und für 1 min. bei 11.000 x g zentrifugiert.

Zu diesem Filtrat wurden 350 µl 70 % Ethanol (EtOH) pipetiert, um die Bindungsbedingungen für die RNA an die NucleoSpin® RNA/Protein Säule zu optimieren und im nachfolgenden Zentrifugationsschritt (30 sek. bei 11.000 x g) die Proteine (Durchfluss) von der RNA (an Säule gebunden) mit Hilfe dieser Säule zu trennen. Die RNA wurde in den weiteren Schritten entsalzt, genomische DNA entfernt und mehrfach gewaschen. Die Elution der RNA erfolgte schließlich in 60 µl RNase-freiem Wasser. Die cDNA wurde nach dem Herstellprotokoll für den High Capacity RNA-to-cDNA Kit synthetisiert.

**Tab. 3.3 A:** Pipettierschema für die cDNA-Synthese.

Menge	Reagenzien
9 µl	RNA
1 µl	20x Enzym Mix
10 µl	2x RT Puffer

**Tab. 3.3 B:** Thermozykler-Programm für die cDNA-Synthese.

Schritt	Temperatur	Zeit
Inkubation/reverse Transkription	37 °C	60 min.
Inaktivierung	95 °C	5 min.
Kühlung	4 °C	∞

Die Konzentration und Qualität der isolierten Nukleinsäuren erfolgte mittels eines UV-Spektrophotometers durch Bestimmung der Lichtabsorbtion bei 260 nm, während das Verhältnis der molaren Extinktionskoeffizienten bei 260 nm und 280 nm die Reinheit der Proben bestimmte.

### 3.5.2 Relative Quantifizierung der mRNA

Die in dieser Arbeit angewandte Methode zur relativen Quantifizierung der mRNA in den Gewebeproben (3.5.1) beider Pathologiemodelle basierte auf der spezifischen Detektion von Amplifikaten unter Verwendung sequenz-spezifischer Hybridisierungs sonden der TaqMan® Gene Expression Assay-Methode.

Die Messung der mRNA-Expressionslevel erfolgte mit dem StepOne™ Real-Time PCR-System (48-Loch-Platte) nach in Tab. 3.4 A und Tab. 3.4 B aufgezeigtem Schema.

**Tab. 3.4 A:** Pipettierschema für TaqMan® Gene Expression Assay-Methode.

Menge	Reagenzien
1 µl	TaqMan® Gene Expression Assay (20x)
2 µl	100 ng cDNA
7 µl	RNase freies H <sub>2</sub> O
10 µl	TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2x)

**Tab. 3.4 B:** Zyklen-Protokoll des StepOne™ Real-Time PCR-Systems.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Carryover-Verdau	50 °C	2 min.	1x
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min.	1x
Denaturierung	95 °C	15 sec.	40x
Primerhybridisierung	60 °C	60 sec.	40x
Elongation	60 °C	60 sec.	40x

Die relative Genexpressionsrate der jeweiligen Zielgene wurde auf Basis der Threshold-Cycle Differenz-Analyse ( $\Delta C_T = C_{T \text{ Probe}} - C_{T \text{ endogene Kontrolle}}$ ) mittels der DataAssist™ Software berechnet. Für diese Kalkulation wurden alle Proben sowie Negativkontrollen (ohne cDNA) in einem doppelten Ansatz analysiert und für die Normalisierung der Proben das Haushalts-Gen GFAP (sauers Gliafaserprotein) als endogene Kontrolle verwendet. Die Berechnung der relativen Genexpressionsrate der jeweils behandelten Gruppe im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe erfolgte auf Basis der komparativen Threshold-Cycle Differenz-Analyse ( $\Delta\Delta C_T$ ).

## 3.6 Protein-Analysen

### 3.6.1 Isolierung der Gesamt-Proteinmenge

Für die Isolation der Gesamt-Proteinmenge wurde mit dem unter Punkt 3.5.1 gewonnen Durchfluss nach den Herstellerangaben und den Reagenzien des NucleoSpin® RNA/Protein-Kit wie folgt weiter vorgegangen. Der gesamte Durchfluss wurde mit derselben Menge an Protein-Präzipitator für 10 min. inkubiert, die gefällten Proteine mit 500 µl 50 % EtOH gewaschen und das Proteinepellet für 30 min. bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet.

Dieses Pellet wurde in 30 µl einer 1 % SDS-Lösung auf einem Heizblock (3 min. bei 98 °C) gelöst, der Überstand für 1 min. bei 11.000 x g zentrifugiert und für die weitere Proteinbestimmung bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Proteine erfolgte ebenfalls UV-spektrophotometrisch mit Hilfe der A-280 Methode. Bei dieser Art der Protein-Messung entspricht eine bei 280 nm gemessenen Absorptionseinheit gleich einer Protein-Konzentration von 1 mg/ml.

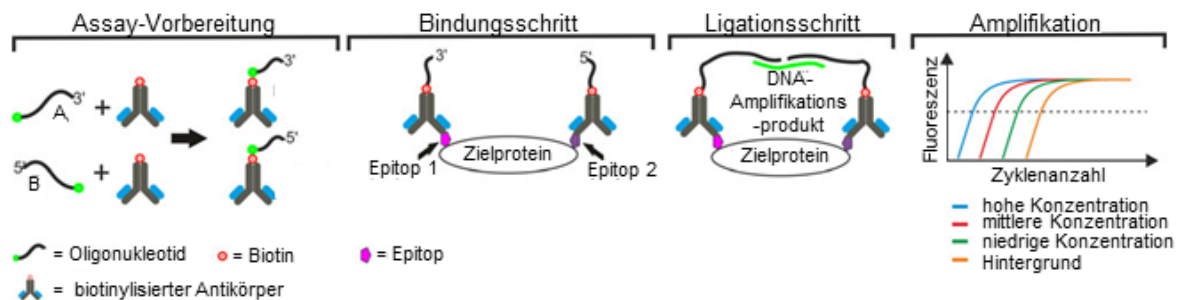
### 3.6.2 TaqMan® Protein Expression Assay-Methode

Auf Grund der limitierenden Faktoren bezüglich der geringen Proteinvolumina/ Proteinkonzentrationen der Gewebeproben wurde ein neues Analyseverfahren zur relativen Mengenbestimmung der Zielproteine herangezogen. Diese TaqMan® Protein Expression Assay-Methode (TPA-Methode) bietet laut Hersteller eine einfache, schnelle und äußerst sensitive Methode zur relativen Quantifizierung von Proteinen in Zell- und Gewebe-Proben (Swartzman et al., 2010). Diese Verfahrensweise basiert auf einer adaptierten Form der Proximity Ligation Assay-Technology (PLA<sup>TM</sup>), welche die Antikörper-Antigen-Bindung mit der qPCR-Methode kombiniert und die Detektion einer Vielzahl funktioneller Proteinklassen erlauben soll.

Auf Grund dieser Verknüpfung erfordert dieses Prinzip laut Hersteller im Gegensatz zu dem häufig angewendeten und ebenfalls sehr sensitiven Enzyme Linked Immunosorbent Assay nur eine Einsatzmenge von 2 µl um mit einer Nachweisgrenze von 1-500 Zellen (0,1-50 ng Gesamt-Protein) bereits eindeutige Ergebnisse zu liefern. Im Kurzen beschrieben umfasst jede TPA-Analyse ein Antigen-spezifisches Assay-Paar, an welches mittels der Biotin-Streptavidin-Interaktion ein 3'-Oligonukleotid (Assay A) bzw. ein 5'-Oligonukleotid (Assay B) gekoppelt ist. Durch die Antigen-Antikörper-Bindung wird das Assay-Paar in „Nähe“



gebracht und bildet mittels DNA-Ligation ein spezifisches DNA-Amplifikationsprodukt, welches mittels qPCR analysiert werden kann (Abb.3.5).



**Abb. 3.5: Schematischer Ablauf der Taqman® Protein Expression Assay-Methode.**

Arbeitsschritte: (1) Assay-Vorbereitung: 3'- und 5'-Oligonukleotid-Bindung an den Antikörper mittels einer Biotin-Streptavidin-Interaktion. 3'-Oligonukleotid + Antikörper = Assay A, 5'-Oligonukleotid + Antikörper = Assay B. (2) Bindungsschritt: Assay A und Assay B binden an die spezifischen Epitope des Zielproteins. (3) Ligationsschritt: Die in „Nähe“ gebrachten Assay-Proben bilden mittels DNA-Ligation ein spezifisches DNA-Amplifikationsprodukt. (4) Amplifikationsschritt: Amplifizierung des Ligationsprodukts und Detektion mittels TaqMan®-basierter quantitativer Echtzeit Polymerasekettenreaktion. Adaptiert nach Pfister et al., 2013.

Zu Beginn der Analyse mussten bei der Auswahl geeigneter Antikörper (AK) in Hinsicht auf die späteren Assays laut Hersteller folgende Kriterien berücksichtigt werden:

**Tab. 3.5: Kriterien der Antikörper für eine TPA-Analyse.**

Antikörper	Länge des Antigens	Konfiguration (Assay A/Assay B)
Polyklonal- Antigen-purifiziert	(1) gesamte Länge oder > 100 aa	einzelner AK oder passendes AK-Paar
	(2) < 100 aa	passendes AK-Paar
Monoklonal	(3)	passendes AK-Paar

### 3.6.2.1 Herstellung der Assay Proben

Im ersten Schritt wurden zunächst die nicht biotinylierten Antikörper mit Hilfe des EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin, No-Weigh™ Format und der Slilde-A-Lyzer® Mini Dialysis Units gemäß den Richtlinien der Herstellerfirma ausreichend biotinyliert (Tab. 3.6 A, Tab. 3.6 B). Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Biotinylierung mussten die betreffenden

Antikörper in amine-freien Puffer bei einer Konzentration von  $\geq 0,5$  mg/ml zur Verfügung stehen.

**Tab. 3.6 A:** Biotinylierung der Antikörper.

<b>Biotinylierung</b>	
Antikörpermenge	0,1 mg
Antikörpervolumen	0,2 ml
Antikörperkonzentration	0,5 mg/ml
Molekulargewicht des Ak	150 kDA (IgG) / 180 kDA (IgY)
Biotinmenge (20 x molare Menge)	$1,33 \times 10^{-5}$ mmol (IgG) / $1,1 \times 10^{-5}$ mmol (IgY)
Volumen (10 mM Biotin-Lsg.)	1,33 $\mu$ l (IgG) / 1,1 $\mu$ l (IgY)
Inkubation	60 min. RT

**Tab. 3.6 B:** Dialyse der biotinylierten Antikörper.

<b>Dialyse</b>		
2x	2 Stunden	500 ml 1x PBS (4 °C)
1x	über Nacht	1000 ml 1x PBS (4 °C)
2x	2 Stunden	500 ml 1x PBS (4 °C)

Nach der Dialyse wurde die Antikörperkonzentration unter Berücksichtigung einer etwaigen Volumenveränderung erneut berechnet und für ein optimales Bindungsverhältnis auf dieselbe Molarität (200 nM) der Oligonukleotidlösungen (TaqMan® Protein Assays Oligo Probe Kit) mittels des Antibody Dilution Buffer (TaqMan® Protein Assays Buffer Kit) gebracht.

Die so behandelten Antikörper wurden im sog. Forced Proximity Probe Test hinsichtlich ihrer Eignung für die spätere Oligonukleotidlösungen nach den Angaben und mit den Kit-Lösungen für die TaqMan® Protein Expression Assay-Methode des Herstellers überprüft.

Dazu wurden zunächst für die Biotin-Streptavidin-Komplexbildung 2  $\mu$ l der AK-Lösung mit 2  $\mu$ l der Prox-Oligo-Mix-Lösung angesetzt, für 60 min. bei RT inkubiert, mit 396  $\mu$ l Antibody Dilution Buffer verdünnt und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Für die Ligationsreaktion der 3'- und 5'-Oligonukleotide wurden zu 4  $\mu$ l dieses Ansatzes 96  $\mu$ l einer Ligations-Lösung gegeben und im Thermozykler für 10 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Ligationsreaktion durch Zugabe von 2  $\mu$ l einer Protease-Lösung bei 37 °C für 10 min. und für weitere 5 min. bei 95 °C im Thermozykler unterbrochen. Die Messung der

Amplifikationsprodukte erfolgte mit dem StepOne™ Real-Time PCR-System (48 Loch-Platte) nach in Tab. 3.6 C und Tab. 3.6 D aufgezeigtem Schema.

**Tab. 3.6 C:** Pipettierschema für den Forced Proximity-Test.

Menge	Reagenzien
11 µl	100µl TaqMan® Protein Expression Assays Fast Master Mix (2x), 10µl Universal PCR Assay
9 µl	protease-behandelte Ligationsprobe

**Tab. 3.6 D:** Zyklen-Protokoll des StepOne™ Real-Time PCR-Systems.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Carryover-Verdau	50 °C	2 min	1x
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	15 sec.	40x
Primerhybridisierung	60 °C	60 sec.	40x
Elongation	60 °C	60 sec.	40x

Die optimale Biotinylierung der Antikörper für die TPA-Methode wurde auf Basis der  $\Delta C_T$ -Anaylse ( $\Delta C_T = C_{T \text{ Probe}} - C_{T \text{ Negativkontrolle}}$ ) mittels der ProteinAssist™ Software berechnet. Für diese Kalkulation wurden alle Proben sowie Negativkontrollen (ohne Oligonukleotid-Lösung) in einem 4-fachen Ansatz analysiert. Positiv getestete biotinylierte Antikörper ( $\Delta C_T \geq 8,5$ ) wurden zunächst für die Langzeitlagerung mit einer 10 % BSA-Lösung (Endkonzentration BSA: 1 mg/ml) versehen, zu je 10 µl in 0,2 ml PCR-Röhrchens aliquotiert und bei - 80 °C gelagert. Die Assay Proben-Vorbereitung geeigneter Antikörper erfolgte nach folgendem Pipettierschema:

**Tab. 3.6 E:** Pipettierschema der Assay-Proben.

Assay Probe A	Assay Probe B
5 µl 200 nm AK	5 µl 200 nm AK
5 µl 200 nm 3' Prox-Oligo-Lsg.	5 µl 200 nm 5' Prox-Oligo-Lsg.
60 min. Inkubation (RT)	60 min. Inkubation (RT)
90 µl Assay Probe Storage Buffer	90 µl Assay Probe Storage Buffer

### 3.6.2.2 TPA-Analysen

Die eigentliche TPA-Analyse wurde nach den Vorgaben und mit den Kit-Lösungen des Herstellers und einer Analyse für eine 48 Loch-Platte entsprechend durchgeführt. Zu Beginn wurde die Proteinprobe für die spätere Normalisierung in ihrer Konzentration photometrisch bestimmt und von der Anfangskonzentration ausgehend eine 2-fache Verdünnungsreihe mit Hilfe des Lysate Dilution Buffers angefertigt. Für die Antikörper-Antigen-Bindung wurden zu 2 µl jedes Verdünnungsansatzes 2 µl der Assay-Proben-Lsg. pipettiert und für 60 min. bei 37 °C im Thermozykler inkubiert. Diesem Ansatz wurde für die nachfolgende Ligationsreaktion der 3'- und 5'-Oligonukleotide 96 µl einer Ligations-Lösung zugefügt und für 10 min. bei 37 °C im Thermozykler inkubiert. Die Amplifikation der Ligationsprodukte erfolgte mit dem StepOne™ Real-Time PCR-System (48 Loch-Platte) nach in Tab. 3.7 aufgezeigtem Schema.

**Tab. 3.7:** Zyklen-Protokoll des StepOne™ Real-Time PCR-Systems.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Carryover-Verdau	50 °C	2 min.	1x
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min.	1x
Denaturierung	95 °C	15 sec.	40x
Primerhybridisierung	60 °C	60 sec.	40x
Elongation	60 °C	60 sec.	40x

Die relative Protein-Quantifizierung der Zielprobe erfolgte wie im Forced Proximity Test auf derselben  $\Delta C_T$ -Analyse mittels der ProteinAssist™ Software v2.0 und es wurden gemäß den Herstellerangaben nur Daten ab einem kritischen Wert von  $\Delta C_T \geq 3$  als statistisch auswertbar angesehen. Für diese Kalkulation wurden ebenfalls alle Proben sowie Negativkontrollen (ohne Oligonukleotid-Lösung) in einem doppelten Ansatz bestimmt und für die Normalisierung die jeweils eingesetzte Proteinmenge herangezogen. Zur Etablierung der Methode wurden verschiedene Proteinproben unterschiedlicher Aufbereitungsmethoden unter Verwendung mehrerer Antikörper getestet sowie einige Optimierungsschritte hinsichtlich der Inkubationszeiten, Antikörperkonzentrationen und der Lysatreagenzien vorgenommen (Tab. S1).

Am Ende dieser Optimierungsschritte konnte für die Quantifizierung des DRD2/DAT in verschiedenen Arealen mit bekanntermaßen hohem Anteil dieser Zielgene (qPCR-Ergebnisse)

wie dem Areal der SN/VTA, den zusammengeführten striatalen Arealen (NAc+ CPu) sowie für grösser eingesetzte Proteinmengen der kritische Wert von  $\Delta CT \geq 3$  nicht überschritten werden, sodass eine Auswertung mit dieser Methode in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war. Auf der einen Seite war die Sonderanfertigung von Antikörpern in amine-freien Puffer von Seiten der Firmen aus Garantiegründen oft ausgeschlossen. Auf der anderen Seite war die Auswahl an Antikörpern, welche gegen die Spezies Ratte und einer Antigenlänge von  $> 100$  Aminosäuren (polyklonale Antikörper) gerichtet waren bzw. an passenden Antikörper-Paaren, sehr gering. Lediglich der Antikörper der Firma Abnova erschien diese Kriterien zu erfüllen, allerdings zeigte sich auch hier bei dem vom Hersteller empfohlenen Aufbereitungskit und den empfohlenen Richtwerten der hierbei enthaltenden Detergenzien sowie einer Probe eines DAT-überexprimierenden Tieres kein besseres Ergebnis. Laut Hersteller liegt das Problem bei dieser Methode häufig in der eigenen Herstellung der Assays aus biotinylierten Antikörpern und den jeweiligen Oligonukleotiden, weshalb sich die Erfolgsquote dieser Methode fast ausschließlich auf die Verwendung von einigen wenigen firmeneigenen Assays beschränkt.

### **3.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot**

#### ***3.6.3.1 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine***

Während des Etablierungsprozederes der TPA-Methode wurden zunächst die selektierten Antikörper vor dem Einsatz in der eigentlichen TPA-Analyse in Bezug auf ihre Antigen-Antikörper-Bindungseigenschaften überprüft. Dazu wurde eine nach dem Macherey und Nagel Kit aufbereitete biologische Gewebeprobe (1/4 naives Rattengehirn) nach deren Molekulargewicht mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) gemäß Laemmli (1970) aufgetrennt. Auf Grund der methodischen Insuffizienz des neuen Analyse-Verfahrens für die einzelnen isolierten Protein-Proben erfolgte deren Quantifizierung ebenfalls im semiquantitativen Western-Blot-Verfahren. Da allerdings die Proteinkonzentration/Probenvolumina der einzelnen Protein-Proben unterhalb der Detektionsgrenze des Western-Blot lagen wurden diese entsprechend ihrer Anatomie zu kortikalen- (getrennt in: mPFC + OFC), striatalen- (getrennt in: NAc + CPu) und subkortikalen- (getrennt in GP + DM + STN) Arealen zusammengeführt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben-Aliquots (25  $\mu$ g Protein) mit 1/3 Volumen an 4x Ladepuffer versehen, für 10 min. bei 70 °C hitze-denaturiert und in die Taschen der

gegossenen Gele eingefüllt. Als Größenstandard wurde pro Gel jeweils eine Tasche mit 10 µg Proteinmarker versehen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in 10 %igen SDS-Gelen (1 mm dick) und einer Elektrophorese-Dauer von ca. 2 h bei 90 - 150 Volt.

### ***3.6.3.2 Relative Quantifizierung der Proteine***

Nach vollendeter SDS-PAGE wurden die im Gel befindlichen Proteine mittels Semi-Dry-Blotverfahren bei 15 V für 1 h auf eine Methanol kalibrierten PVDF-Membran den Herstellerangaben folgend (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell) übertragen. Die Effizienz des Protein-Transfers wurde anschließend durch 5-minütige Ponceau-Färbung der Membran überprüft. Nach 10-minütiger Entfärbung der Membran mit ddH<sub>2</sub>O erfolgte zur Sättigung unspezifischer Proteinbindestellen die Inkubation in der SuperBlock Blocking-Lösung für 1 h bei RT. Die primären Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:200 (bzw. 1:800  $\beta$ -Actin) in der Blockier-Lösung verdünnt und direkt auf die Membran gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei +4 °C wurde die Membran dreimal für 10 min. in 1x PBST gewaschen, die Zweitantikörper bei einem Verhältnis von 1:5000 in der Blockier-Lösung (bzw. 5 % BSA für  $\beta$ -Actin) verdünnt und für eine Stunde bei RT auf die Membran verbracht. Das anschließende Waschen der Membran zur Entfernung der nicht-gebundenen Sekundärantikörper erfolgte dreimal für 15 min. in 1x PBST.

Auf Grund der relativ hohen Anzahl an Zielproteinen sowie der geringen Proteinvolumina wurde für die immunoreaktiven Nachweise der unterschiedlichen Zielproteine die Membran mehrfach gestripped. Dieser Vorgang ermöglicht vorherige Antikörper auf der Membran zu entfernen und sie bis zu fünf Mal mit neuen primär/sekundär Antikörperpaaren zu inkubieren. Dazu wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit 1x PBST, dann 15 Minuten mit dem Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer und abschließend dreimal 5 min. mit 1x PBST gewaschen. Jede Membran wurde hierzu insgesamt dreimal gestrippt, sodass alle Zielproteine für jede einzelne Membran nachgewiesen werden konnten. Die immunoreaktive Detektion wurde mittels des ECL-Systems nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und die Blots 5 min. licht-exponiert. Die semiquantitative Auswertung dieser Kamerabilder wurde densitometrisch anhand von Image J ausgewertet und für die Normalisierung das Haushalts-Protein  $\beta$ -Actin (Referenz) verwendet.

### **3.7 Biochemische Analysen**

#### **3.7.1 Gewebeaufbereitung**

Die biochemische Aufbereitung der unter Punkt 3.4 gewonnen Gewebeproben der transgenen Tiere bezog sich auf folgende Areale, welche aus je einer Hemisphäre gewonnen wurde: mPFC (getrennt in: CG1 + PrL + IL), OFC (getrennt in: VO + LO), NAc, CPu, GP (getrennt in: LGP + MGP), HPC, DM, STN sowie SN/VTA. Diese Gewebestanzten wurden zunächst jeweils in dem 20-fachen Volumen einer 0,1 N Perchlorsäure bei +4 °C mittels Ultraschall homogenisiert, 100 µl dieser Suspension für die weitere Proteinbestimmung aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Der verbleibende Analyt wurde für 15 min. bei +4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und zu 20 µl des Überstandes der gleiche Anteil an 0,5 M o-Phthalaldehyd-Lösung optische Dichte (OD) 104 für die direkte Bestimmung der Aminosäuren pipettiert. Die restliche obere Phase wurde zur direkten Analyse der Neurotransmitter verwendet.

Die Gesamt-Protein Konzentration des Gewebematerials wurde nach der Methode von Lowry und Mitarbeitern (1951) durchgeführt. Zunächst wurde zu 100 µl Homogenat dieselbe Menge einer 1 N Natriumhydroxid-Lösung gegeben, über Nacht inkubiert und diese Lösung in einem Verhältnis von 1:4 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt. Zur Eichung des Spektrophotometers wurden folgende Protein-Standardlösungen aus einer 0,5 mg/ml BSA-Lösung in dH<sub>2</sub>O hergestellt: 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml und 1,25 mg/ml. Sowohl für die Eichkurve als auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Jeweils 2000 µl „Lowry“-Reagenz wurde in eine Küvette pipettiert, 500 µl Protein-Standardlösung bzw. Probe und 200 µl Folin-Reagenz hinzu gegeben und gemischt. Nach 60 min. wurde von jedem Ansatz die Extinktion gemessen wobei H<sub>2</sub>O als Blindwert diente.

Die gemessenen Extinktionen wurden als Funktion der Konzentration mittels der erstellten Eichkurve in mg/ml festgelegt und für die spätere Kalkulation der Neurotransmitter und Aminosäuren herangezogen.

#### **3.7.2 Neurochemische Messungen**

Für die Bestimmung der Neurotransmitter DA und 5-HT sowie deren Metabolite, DOPAC, HVA und 5-Hydroxyindolylelessigsäure (5-HIAA) wurde als elektrochemisches Detektionssystem die Umkehrphasen-Hochflüssigkeitschromatographie herangezogen (Felice et al. 1978; Sperk et al., 1981, Sperk, 1982). Die aufbereiteten Proben wurden anhand dieser chromatographischen Trennmethode mittels einer Säule (stationäre Phase) und eines

geeigneten Eluents (mobile Phase) bei einer Durchflussrate von 0,55 ml/min und einer Stromstärke von 50 nA voneinander getrennt. Die Neurotransmitter wurden mittels eines elektrochemischen Detektors bei einem Elektrodenpotential von 0,8 V ermittelt. Die Proben-Analyse basierte auf der Auswertung der ermittelten Peaks an Hand eines Computer-basierten chromatographischen Daten-Systems. Als Kalibrierung wurde eine Standardlösung eingesetzt, welche jeweils vor und nach der Probenanalyse aufgegeben wurde.

Die Bestimmung der Aminosäuren (Glu, Glutamin, GABA) erfolgte nach der Methodik von Piepponen und Skujins (2001). Die Proben wurden mittels gekühlter Autoinjektion aufgegeben, durchliefen eine vorgeschaltete Säule mit einer Derivatisierungslösung, ehe sie anschließend mittels einer HPLC-Säule und des geeigneten Eluents bei einer Durchflussrate von 0,6 ml/min und konstanter Säulentemperatur von 40 °C in einem linearen Gradientensystem voneinander separiert wurden. Die fluoreszierende Detektion der derivierten Aminosäuren erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm nachdem die Proben mit einer Wellenlänge von 330 nm angeregt wurden. Eine Eichung des Systems erfolgte über mehrere Standardlösungen.

### 3.8 Statistische Auswertungen

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms SigmaPlot 13.0. Zu Beginn wurden die Daten auf ihre Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und Homogenität der Varianz (Brown-Forsythe-Test) überprüft und gegebenenfalls logarithmisch zur Basis 10 (log) transformiert. Im Fall von transformierten Daten sind diese Werte jeweils durch das Symbol (\*) gekennzeichnet. Für die Verhaltensversuche auf dem offenen Feld des pharmakologischen Pathologiemodells wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-way analysis of variance) mit den Parametern Substanzart (NaCl vs. QNP) und Behandlungsdauer (akut vs. chronisch) durchgeführt. Mögliche paarweise Mittelwertvergleiche erfolgten nach dem Post-hoc Holm-Sidak-Test. Für alle anderen statistischen Analysen wurde entweder ein zweiseitiger unabhängiger t-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test für die Gruppen DAT vs. Wildtyp und NaCl<sub>akut</sub> vs. QNP<sub>akut</sub> bzw. NaCl<sub>chronisch</sub> vs. QNP<sub>chronisch</sub> angewandt. Die statistische Signifikanz wurde für den Wert von  $p < 0,05$  festgelegt. In den entsprechenden Abbildungen sind jeweils die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern dargestellt ( $\pm$  SEM).



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Generierung und erste Charakterisierung der transgenen Tiere

#### 4.1.1 Generierung

Insgesamt überlebten von den 393 mikroinjizierten befruchteten Zygoten 83 %. Eine erfolgreiche Integration des Transgens belief sich bei 109 potenziell transgen-positiven Startindividuen der 32 Würfe auf ein weibliches Tier. Nach Verpaarungen dieses transgen-positiven Tieres mit Wildtypen des gleichen Stammes, sowie einer weiteren Geschwisterverpaarung dieser Nachkommen, gingen in der F2-Generation schließlich genügend heterozygote Nachkommen ( $n=6$ ) für die spätere homozygote Linie hervor. Die Anzahl erster homozygoter Ratten in der F3-Generation konnte schließlich mit 6 Nachkommen bemessen werden, was eine ausreichende Tieranzahl für die weitere rein homozygote Zucht-(Erhaltung) darstellte.

**Tab. 4.1: Quantitative Verteilung der Genotypen.**

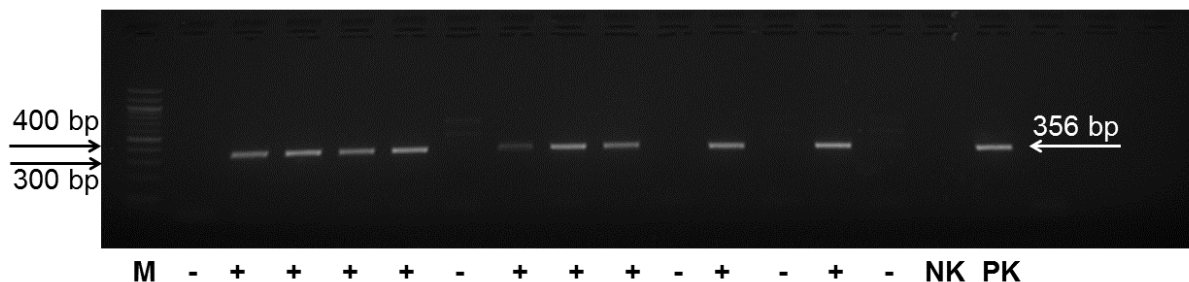
Die Tabelle zeigt die quantitative Verteilung in den jeweiligen Generationen der transgenen Ratten. F0 = erste transgene Tiere, F1/2/3 = erste/zweite/dritte Folgegeneration.

Generation	Anzahl der Würfe	Gesamtzahl der Tiere	Wildtyp (-/-)	Heterozygot (+/-)	Homozygot (+/+)
F0 (Mikroinjektion)	32	109	0	1 1 %	0
F1 (♀+/- x ♂-/-)	3	22	21 (95 %)	1 (5 %)	0
F2 (♀+/- x ♂-/-)	1	7	1 (14 %)	6 (86 %)	0
F3 (♀+/- x ♂+/-)	2	19	4 (21 %)	9 (47 %)	6 (32 %)

#### 4.1.2 Genotypisierung

Für die Identifikation der transgenen Ratten wurden alle potentiell transgen-positiven Tiere mittels PCR unter Verwendung der spezifischen Primer (NSEf/DATr) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese genotypisiert. Die Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Agarose-Gelelektrophorese der jeweiligen PCR-Produkte transgen-positiver- und transgen-negativer Ratten. Die Abkömmlinge der F3-Generation wurden zur Identifikation

der Homozygotie mit Wildtypen verpaart und als solche deklariert, falls alle Nachkommen dieses Wurfes positiv auf das Transgen getestet wurden.



**Abb. 4.1: Repräsentative Abbildung zur Identifizierung transgener Tiere.**

Dargestellt ist ein 2%iges ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung von genomischen PCR-Produkten transgen-positiver- und transgen-negativer Ratten. Die mit einem weißen Pfeil markierte transgen-spezifische Bande liegt bei 356 bp. M = 100 bp Marker, NK = Negativkontrolle, PK = Positivkontrolle, (+) = transgen-positives Tier, (-) = transgen-negatives Tier.

#### 4.1.3 Allgemeine Auffälligkeiten

Im Laufe der Zucht(-Erhaltung) zeigten die homozygoten Weibchen ein abnormes Brutpflegeverhalten sowie eine geringe Trächtigkeit von nur 1-2 Würfen unabhängig vom Genotyp des männlichen Tieres. Diese Muttertiere zeigten keinerlei Brutpflegeverhalten was Nestbau, Zurückbringen des Nachwuchses sowie Wärmen und Säugen der Nachkommen umfasst, sodass eine Ammenaufzucht stets erforderlich war. Die Anzahl homozygoter Nachkommen belief sich bei den rein homozygoten Verpaarungen und einer Gesamtzahl von 42 Nachkommen auf durchschnittlich 6,8 Tiere pro Wurf und einer Sterblichkeitsrate von 7%. Angesichts dessen wurde ein umfassendes Kleintierscreening eines 3 Monate alten homozygoten Weibchens im Vergleich zu einem gleichaltrigen Wildtyp-Weibchen erstellt und die Organe von 3 weiblichen homozygoten Ratten (Alter: 3 Monate) augenscheinlich von einer Veterinärmedizinerin untersucht. Diese Befunde ergaben eine mittelmäßig vergrößerte Nebenniere aller weiblichen Tiere, wobei im Blutbild neben weiteren Abweichungen zum Kontrolltier, insbesondere erniedrigte Schilddrüsen-Werte (T3/T4), erhöhte Cortisol-Werte und ein reduzierter Spiegel des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) gemessen wurden (Tab. 4.2).

**Tab. 4.2: Kleintierscreening eines homozygoten Weibchens und dessen Wildtyp.**

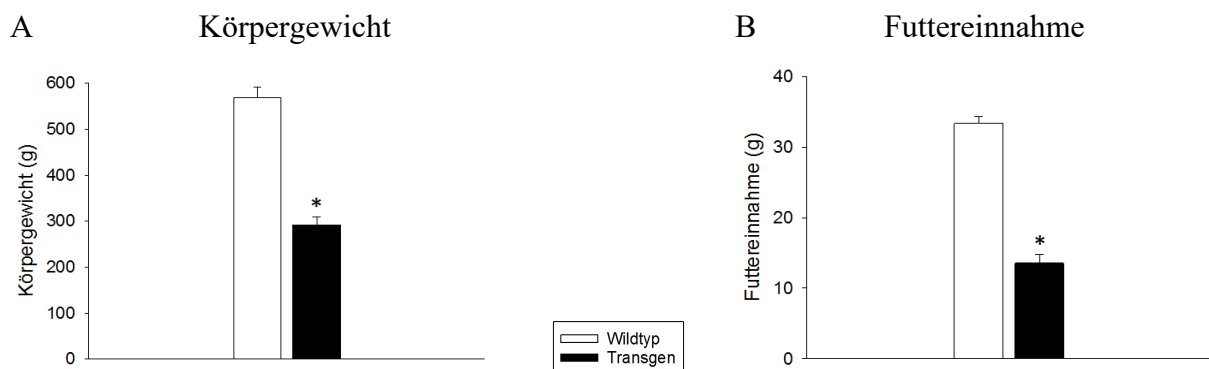
In der Tabelle sind die Werte des umfassenden Kleintierscreenings eines 3 Monate alten homozygoten Weibchens im Vergleich zu einem gleichaltrigen Wildtyp-Weibchen aufgelistet. Rot markierte Zahlen geben reduzierte Werte an und grün markierte Zahlen erhöhte Werte. x = kein Referenzbereich angegeben. ACTH = Adrenocorticotropes Hormon, ALT = Alanin-Aminotransferase, AST = Aspartat-Aminotransferase, GLDH = Glutamatdehydrogenase, MCH = mittleres corpuskuläres Hämoglobin, MCHC = mittlere corpuskuläre Hämoglobin-Konzentration, MCV = mittleres corpuskuläres Volumen, T3 = Trijodthyronin, T4 = Tetrajodthyronin, THS = Thyreoidea stimulierendes Hormon.

	homozygot ♀	Kontrolle ♀	Einheit	Referenzbereich
<b>Leukozyten</b>	1,40	14,70	G/l	6,00 - 17,00
<b>Erythrozyten</b>	10,90	10,19	T/l	7,20 - 9,60
<b>Hämoglobin</b>	202,00	181,00	g/l	x
<b>Hämatokrit</b>	0,51	0,48	l/l	0,36 - 0,48
<b>MCV</b>	47,00	47,10	fl	x
<b>MCH</b>	18,50	17,80	pg	x
<b>MCHC</b>	39,50	37,70	g/dl	x
<b>Thrombozyten</b>	766,00	710,00	G/l	500,00 - 1300,00
<b>alk. Phosphatase</b>	105,00	302,00	U/l	186,00 - 457,00
<b>AST</b>	232,00	105,00	U/l	67,00 - 150,00
<b>ALT</b>	106,00	85,00	U/l	x
<b>GLDH</b>	63,00	< 2,00	U/l	x
<b>Bilirubin gesamt</b>	1,20	2,90	µmol/l	1,71 - 6,84
<b>Triglyzeride</b>	< 0,10	1,42	mmol/l	x
<b>Kreatinin</b>	21,90	25,60	µmol/l	18,00 - 71,00
<b>Harnstoff</b>	14,06	5,04	mmol/l	x
<b>Natrium</b>	140,00	140,00	mmol/l	133,00 - 145,00
<b>Kalium</b>	4,10	4,70	mmol/l	3,50 - 8,90
<b>Calcium</b>	2,31	2,79	mmol/l	2,50 - 3,50
<b>Phosphat</b>	2,73	2,05	mmol/l	x
<b>Glukose</b>	< 0,60	6,61	mmol/l	2,77 - 7,49
<b>Fruktosamin</b>	164,00	155,00	µmol/l	x
<b>Gallensäure</b>	7,40	9,20	µmol/l	x
<b>Albumin</b>	32,80	33,50	g/l	x
<b>Gesamteiweiß</b>	57,00	72,00	g/l	56,00 - 76,00
<b>TSH</b>	< 0,03	< 0,03	ng/l	x
<b>T4</b>	1,05	5,61	µg/l	x
<b>T3</b>	< 0,30	0,61	ng/l	x
<b>ACTH</b>	300,00	> 1250	pg/l	x
<b>Cortisol</b>	35,00	5,00	ng/l	x

Darüber hinaus sind bei einer abschließenden Beurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien Parameter wie ein struppiges Fell, ein kleiner Körperwuchs, inaktives Verhalten und das Verharren in zusammengekauelter Körperhaltung zu beurteilen.

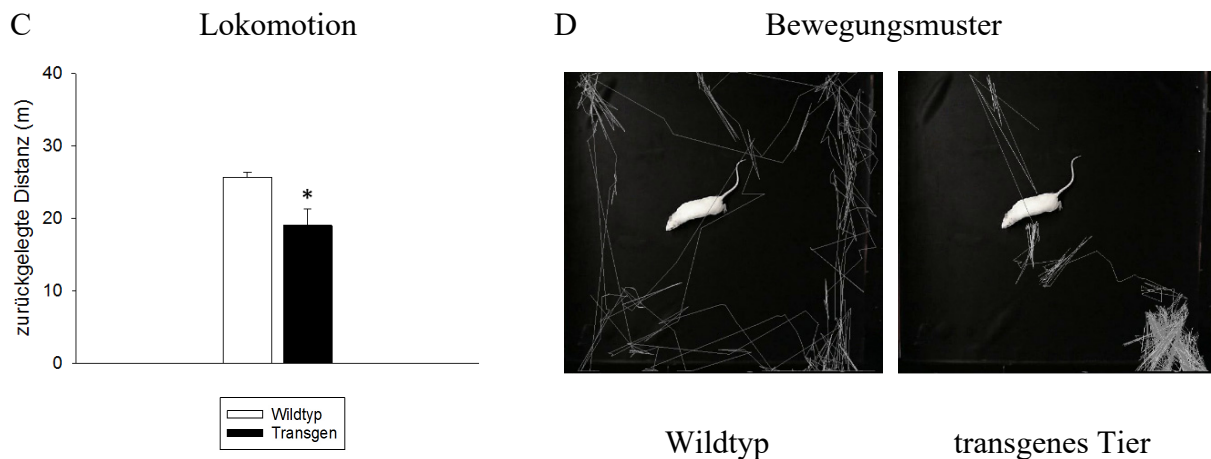
Unter Berücksichtigung all dieser Aspekte wurde die Belastung dieser homozygoten Linie bei 24 analysierten Ratten ( $\text{♀} = 8$ ,  $\text{♂} = 16$ ) unterschiedlichen Alters mit 75 % veranschlagt, wobei sich die männlichen Nachkommen zunächst nahezu vergleichbar zu ihren Wildtypen entwickelten, ehe sie im Alter von circa 3 Monaten phänotypisch stark durch ihr struppiges Fell, ihr ausgeprägt vermindertes Gewicht und ihre Hypolokomotion auffällig wurden. Das augenscheinlich reduzierte Körpergewicht der homozygoten Männchen wurde über ein circa 50 % vermindertes Körpergewicht gegenüber den Wildtypen bestätigt [ $t(30) = -9,63$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.2 A]. Zudem konsumierten die homozygoten Männchen im Vergleich zu den Wildtypen circa 60 % weniger pelletiertes Futter [ $T(8) = 40,00$ ;  $p = 0,008$ /Abb. 4.2 B]. Des Weiteren unterstützten die Lokomotions-Ergebnisse der zurückgelegten Gesamtstrecke auf dem offenen Feld, die Annahme einer stark verminderten lokomotorischen Aktivität der homozygoten Männchen gegenüber den Wildtypen [ $t(8) = -3,87$ ;  $p = 0,005$ /Abb. 4.2 C].

Unter Berücksichtigung der hier zusammengetragenen Angaben wurde in den nachfolgenden Untersuchungen außerhalb der vorliegenden Arbeit auf eine heterozygote Zucht umgestellt, welche als belastungsfrei eingestuft wurde.



**Abb. 4.2 A,B: Verhaltensauffälligkeiten im Körpergewicht und der Futtereinnahme.**

**Abb. A:** Gemittelttes Körpergewicht  $\pm$  SEM (in g) der transgenen Tiere und der Wildtypen, gemessen im Alter von circa 3 Monaten. Homozygot:  $n = 17$ , Wildtyp:  $n = 15$ ;  $*p < 0,001$ ; nach unabhängigen t-Test. **Abb. B:** Gemittelte Futtereinnahme  $\pm$  SEM (in g) der transgenen Versuchstiere und deren Wildtypen, gemessen über fünf Tage im Alter von circa 3 Monaten. Homozygot:  $n = 5$ , Wildtyp:  $n = 5$ ;  $*p < 0,01$ ; nach Mann-Whitney-U-Test.



**Abb. 4.2 C, D: Verhaltensauffälligkeiten in der Lokomotion.**

**Abb. C:** Gemittelte lokomotorische Aktivität  $\pm$  SEM (in m) der transgenen Tiere und der Wildtypen im Alter von circa 3 Monaten. Gemessen über 2 Tage für je 10 min. an der Gesamtstrecke auf dem offenen Feld. Homozygot:  $n=5$ , Wildtyp:  $n=5$ ;  $*p < 0,01$ ; nach unabhängigen t-Test. **Abb. D:** Repräsentatives Bewegungsmuster der transgenen Versuchstiere und deren Wildtypen im Alter von circa 3 Monaten. Aufgenommene Gesamtstrecke für je 10 min auf dem offenen Feld.

## 4.2 Biochemische Analysen des transgenen Pathologiemodells

### 4.2.1 DA, 5-HT, GABA und Glu

Das Ausmaß der genetischen Manipulation auf die Mengen relevanter Neurotransmitter innerhalb des BGTC Regelkreises wurde über die Messwerte von DA, 5-HT, GABA und Glutamat bestimmt. Im Vergleich zu den Wildtypen wiesen die transgenen Ratten enorm verringerte DA-Werte im OFC [- 96 %;  $T(13) = 28,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.3 B], im CPu [- 84 %;  $T(14) = 36,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.3 D], im DM [- 79 %;  $T(13) = 28,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.3 G] und im NAc auf [- 74 %;  $t(14) = -14,96$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.3 C]. Ebenfalls deutlich verringerte DA-Menge wurden im GP [- 51 %;  $T(13) = 84,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.3 E] und im mPFC ermittelt [- 33 %;  $t(12) = -2,73$ ;  $p = 0,018$ /Abb. 4.3 A].

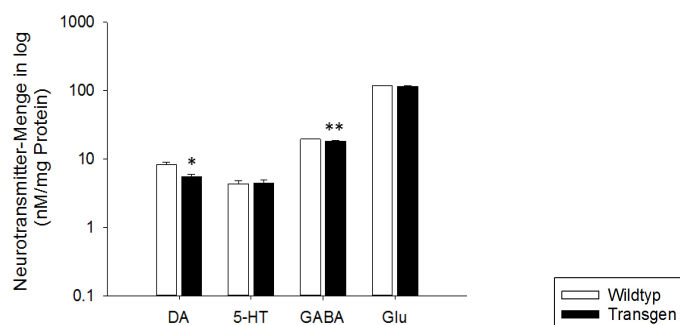
Des Weiteren zeigten sich im Unterschied zu den Wildtypen bei den transgenen Ratten ein klarer Serotonin-Abfall im DM [- 68 %;  $t(13) = -7,99$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.3 G], im HPC [- 43 %;  $t(13) = 3,04$ ;  $p = 0,009$ /Abb. 4.3 F] und im OFC [- 41 %;  $T(13) = 35,00$ ;  $p = 0,014$ /Abb. 4.3 B].

Ferner ergaben sich divergente Ergebnisse für den Neurotransmitter GABA. Im Vergleich zu den Wildtypen wiesen die transgenen Tiere einerseits eindeutig erhöhte Werte im GP [+ 45 %;  $t(12) = 5,25$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.3 E] und im CPu auf [+ 19 %;  $t(12) = 4,88$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.3 D], andererseits zeichnete sich ein deutlich verringertes GABA-Level im

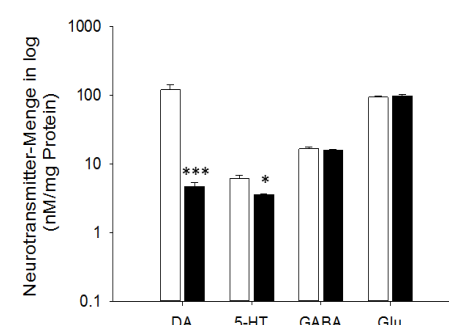
DM [- 22 %;  $t(13) = -4,54$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.3 G] und im mPFC ab [- 6 %;  $t(11) = -3,14$ ;  $p = 0,009$ /Abb. 4.3 A].

Darüber hinaus wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede der in diesem Abschnitt beschriebenen Neurotransmitter sowie des exzitatorisch wirkenden Botenstoffs Glutamat ermittelt ( $p_{\text{jeweils}} > 0,05$ ).

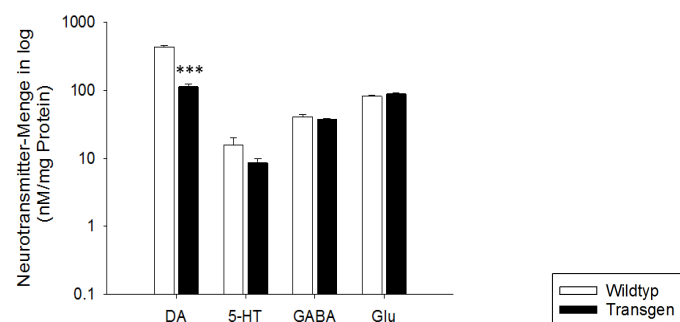
**A** medialer präfrontaler Kortex



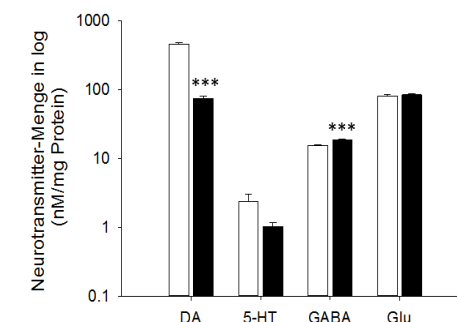
**B** orbitofrontaler Kortex



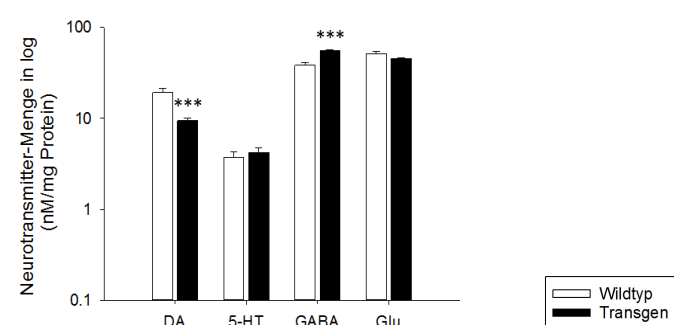
**C** Nucleus accumbens



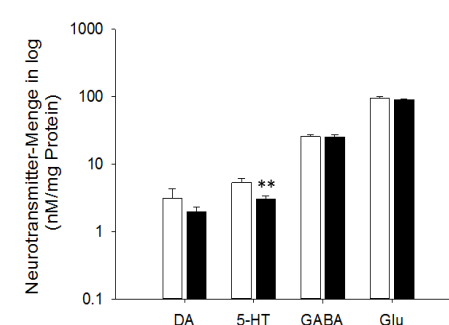
**D** Caudatus-Putamen

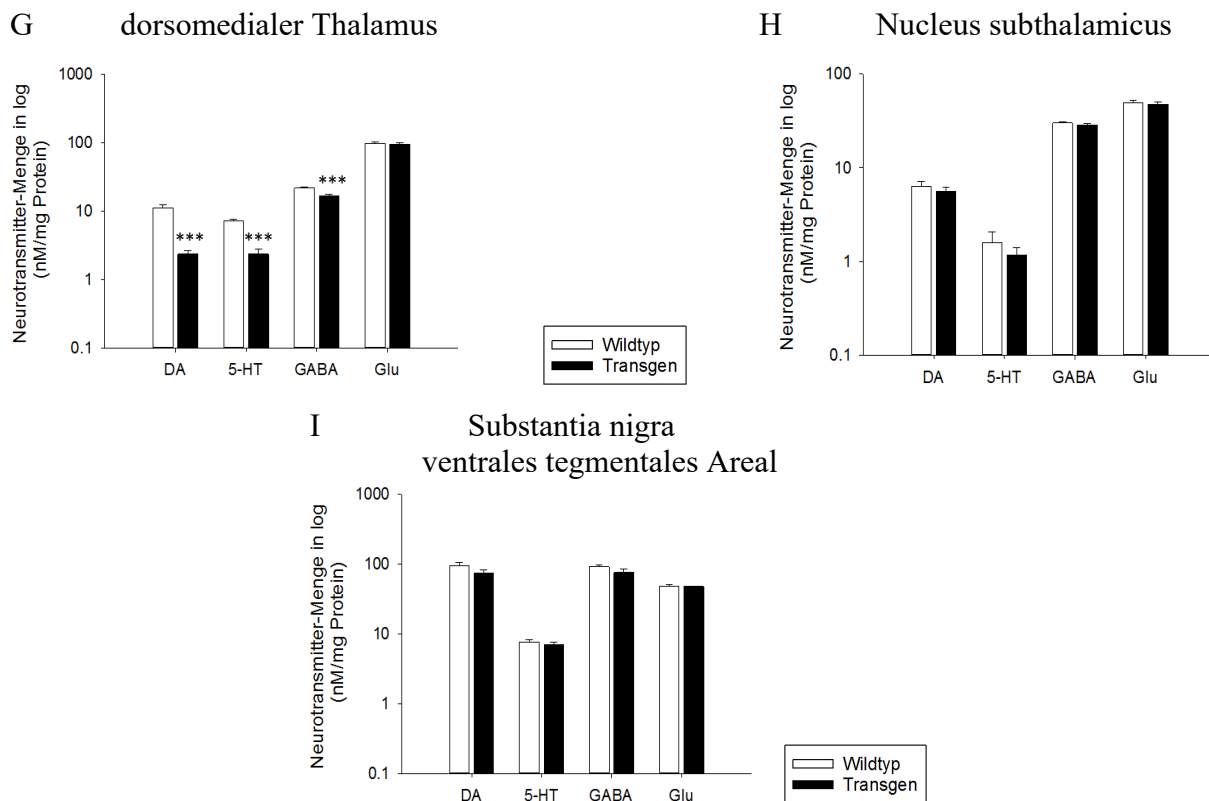


**E** Globus Pallidus



**F** Hippocampus





**Abb. 4.3 A-I: Neurotransmitter-Mengen für DA, 5-HT, GABA und Glu.**

Abgebildet sind die gemittelten Neurotransmitter-Mengen  $\pm$  SEM (log in nM/mg Protein) für Dopamin (DA), Serotonin (5-HT), Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Glutamat (Glu) in den verschiedenen Gehirnregionen der transgenen Ratten und der Wildtypen. Homozygot: n = 6-8, Wildtyp: n = 6-8; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; nach unabhängigen t-Test bzw. nach Mann-Whitney-U-Test.

#### 4.2.2 DOPAC, HVA, 5-HIAA und Glutamin

Die Tabelle 4.3 zeigt die Messergebnisse der analysierten Stoffklassen DOPAC, HVA, 5-HIAA und Glutamin der transgenen Tiere und deren Wildtypen in den verschiedenen Gehirnregionen des BGTC Regelkreises. Für den DAergen Metaboliten HVA wiesen die transgenen Tiere gegenüber den Wildtypen signifikant erhöhte Messwerte in allen untersuchten Gehirnarealen auf. Hierunter war die stärkste Zunahme im mPFC [Faktor: + 9,84; T(13)=28,00; p < 0,001], im GP [Faktor: + 9,67; T(14)= 100,00; p < 0,001] und im HPC [Faktor: + 7,15; T(14)= 85,00; p = 0,005]. Ein ebenfalls ausgeprägter Anstieg wurde im NAc [Faktor: + 4,82; t(13)= 7,56; p < 0,001] und im CPu gemessen [Faktor: + 4,17; t(14)= 10,22; p < 0,001], während sich eine eher geringfügige Steigerung in dem Areal des STN [Faktor: + 2,42; T(13)= 84,00; p < 0,001], der SN/VTA [Faktor: + 2,3; t(13)= 6,71; p < 0,001], des DM [Faktor: + 1,83; T(14)= 92,00; p = 0,012] und des OFC ergab [Faktor: + 1,59; T(13)= 84,00; p < 0,001].

Für den zweiten analysierten DAergen Metaboliten DOPAC wurde im Vergleich zu den Wildtypen bei transgenen Ratten eine starke Zunahme im HPC festgestellt [Faktor: + 8,22;  $T(13) = 84,00$ ;  $p < 0,001$ ]. Zudem wurde ein ebenfalls signifikanter Anstieg im GP [Faktor: + 4,64;  $T(14) = 100,00$ ;  $p < 0,001$ ], im mPFC [Faktor: + 3,37;  $t(13) = 6,83$ ;  $p < 0,001$ ], im STN [Faktor: + 3,07;  $t(13) = 5,01$ ;  $p < 0,001$ ], im DM [Faktor: + 3,02;  $t(14) = -2,68$ ;  $p = 0,018$ ], im CPu [Faktor: + 2,46;  $t(14) = 5,23$ ;  $p < 0,001$ ] und im NAc ermittelt [Faktor: + 1,55;  $t(14) = 2,12$ ;  $p = 0,045$ ].

Ferner zeigte sich bei transgenen Tieren gegenüber den Wildtypen eine deutliche Steigerung für den serotonergen Metaboliten 5-HIAA im mPFC [Faktor: + 2,24;  $T(14) = 100,00$ ;  $p < 0,001$ ] und im GP [Faktor: + 2,00;  $T(14) = 88,00$ ;  $p = 0,038$ ]. Dementgegen konnte im Vergleich zu den Wildtypen im DM transgener Ratten ein deutlicher Abfall verzeichnet werden [Faktor: - 1,64;  $t(13) = -3,21$ ;  $p = 0,007$ ].

Für die Aminosäure Glutamin wiesen die transgenen Ratten im Vergleich zu den Wildtypen einen klar erhöhten Messwert im NAc auf [Faktor: + 1,14;  $T(32) = 13,00$ ;  $p = 0,004$ ].

Darüber hinaus wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede der in diesem Abschnitt beschriebenen biochemischen Stoffe ermittelt ( $p_{\text{jeweils}} > 0,05$ ).

**Tab. 4.3: Neurotransmitter-Mengen für DOPAC, HVA, 5-HIAA und Glutamin.**

Aufgelistet sind die gemittelten Stoffmengen  $\pm$  SEM (in nM/mg Protein) für 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA), 5-Hydroxyindolylessigsäure (5-HIAA) und Glutamin in den verschiedenen Gehirnregionen der transgenen Ratten (Tr.) und der Wildtypen (WT). mPFC = medialer präfrontaler Kortex, OFC = orbitofrontaler Kortex, NAc = Nucleus accumbens, CPu = Caudatus-Putamen, GP = Globus pallidus, HPC = Hippocampus, DM = dorsomedialer Thalamus, STN = Nucleus subthalamicus, SN/VTA = Substantia nigra/ventrales tegmentales Areal. Homozygot:  $n = 6-8$ , Wildtyp:  $n = 6-8$ ; n.d. = nicht determiniert; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; nach unabhängigen t-Test bzw. nach Mann-Whitney-U-Test.

		DOPAC	HVA	5-HIAA	Glutamin
mPFC	WT	1,24 $\pm$ 0,16	1,41 $\pm$ 0,21	1,88 $\pm$ 0,16	39,98 $\pm$ 1,14
	Tr.	4,18 $\pm$ 0,42***	13,87 $\pm$ 1,64 ***	4,22 $\pm$ 0,49 ***	42,32 $\pm$ 1,26
OFC	WT	13,27 $\pm$ 2,01	10,15 $\pm$ 1,16	2,71 $\pm$ 0,16	42,53 $\pm$ 2,12
	Tr.	17,90 $\pm$ 3,16	40,54 $\pm$ 5,89***	4,25 $\pm$ 0,62	41,24 $\pm$ 0,98
NAc	WT	66,68 $\pm$ 14,85	17,96 $\pm$ 4,20	4,16 $\pm$ 1,07	56,96 $\pm$ 0,62
	Tr.	103,49 $\pm$ 7,76*	86,67 $\pm$ 7,62 ***	4,57 $\pm$ 0,60	64,88 $\pm$ 2,04**
CPu	WT	65,46 $\pm$ 11,77	37,58 $\pm$ 6,84	0,82 $\pm$ 0,38	52,06 $\pm$ 1,72
	Tr.	161,36 $\pm$ 13,84***	156,76 $\pm$ 9,45***	1,42 $\pm$ 0,35	52,94 $\pm$ 1,00
GP	WT	3,23 $\pm$ 0,34	2,41 $\pm$ 0,27	1,95 $\pm$ 0,21	30,69 $\pm$ 1,17
	Tr.	14,98 $\pm$ 1,75 ***	23,31 $\pm$ 3,19 ***	3,91 $\pm$ 0,89*	30,774 $\pm$ 0,80
HPC	WT	0,23 $\pm$ 0,08	0,33 $\pm$ 0,33	2,86 $\pm$ 0,32	41,59 $\pm$ 2,54
	Tr.	1,89 $\pm$ 0,15 ***	2,36 $\pm$ 0,19**	3,73 $\pm$ 0,54	41,13 $\pm$ 0,98
DM	WT	0,55 $\pm$ 0,08	n.d.	2,96 $\pm$ 0,15**	45,22 $\pm$ 0,73
	Tr.	1,66 $\pm$ 0,41*	1,83 $\pm$ 0,50*	1,64 $\pm$ 0,36	43,38 $\pm$ 1,27
STN	WT	0,54 $\pm$ 0,09	n.d.	0,68 $\pm$ 0,25	29,88 $\pm$ 1,96
	Tr.	1,66 $\pm$ 0,41 ***	2,42 $\pm$ 0,23 ***	0,90 $\pm$ 0,19	29,25 $\pm$ 1,19
SN/VTA	WT	12,21 $\pm$ 1,91	3,49 $\pm$ 0,52	1,86 $\pm$ 0,24	34,48 $\pm$ 2,90
	Tr.	14,73 $\pm$ 1,10	8,02 $\pm$ 0,40 ***	1,98 $\pm$ 0,37	34,91 $\pm$ 1,93



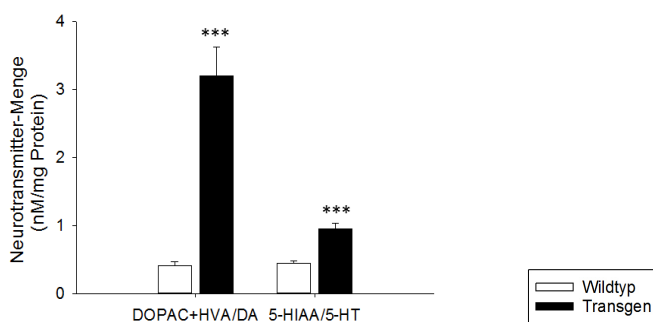
### 4.2.3 Dopaminerge- und serotonerge Umsatzrate

Die genetische Einflussnahme bewirkte im Vergleich zu den Wildtypen in allen untersuchten Gehirnarealen einen eindeutig erhöhten DA-Umsatz bei den transgenen Tieren. Die höchsten Umsatzraten waren im OFC [Faktor: + 56,27;  $T(14)=36,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.4 B] und im HPC zu verzeichnen [Faktor: + 39,83;  $T(14)=100,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.4 F]. Weiterhin zeigte sich ein ebenfalls starker Anstieg im DM [Faktor: + 24,8;  $T(13)=35,00$ ;  $p = 0,014$ /Abb. 4.4 G], im CPu [Faktor: + 20,48;  $T(14)=36,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.4 D] und im GP [Faktor: + 16,07;  $T(14)=100,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.4 E]. Darüber hinaus wurden mäßiger Steigerungen in dem Areal des NAc [Faktor: + 11,37;  $T(13)=28,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.4 C], des STN [Faktor: + 9,25;  $T(14)=36,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 14 H], der SN/VTA [Faktor: + 8,22;  $t(14) = -5,88$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.4 I] und des mPFC gemessen [Faktor: + 7,80;  $t(14)=100,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.4 A].

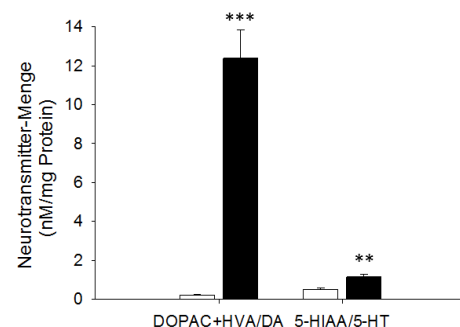
In Bezug auf den Neurotransmitter 5-HT ergaben sich gegenüber den Wildtypen ebenfalls signifikant erhöhte Umsatzraten für die transgenen Ratten. Der stärkste Anstieg wurde im CPu gemessen [Faktor: + 8,32;  $t(13)=3,26$ ;  $p = 0,006$ /Abb. 4.4 D], während eine eher mäßig gesteigerte Umsatzrate im STN [Faktor: + 3,84;  $t(14) = -2,85$ ;  $p = 0,013$ /Abb. 4.4 H], im HPC [Faktor: + 2,81;  $T(14)=94,00$ ;  $p = 0,005$ /Abb. 4.4 F], im OFC [Faktor: + 2,23;  $t(14)=3,56$ ;  $p = 0,003$ /Abb. 4.4 B], im mPFC [Faktor: + 2,11;  $T(14)=36,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.4 A] und im NAc ermittelt wurde [Faktor: + 1,96;  $T(12)=69,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.4 C].

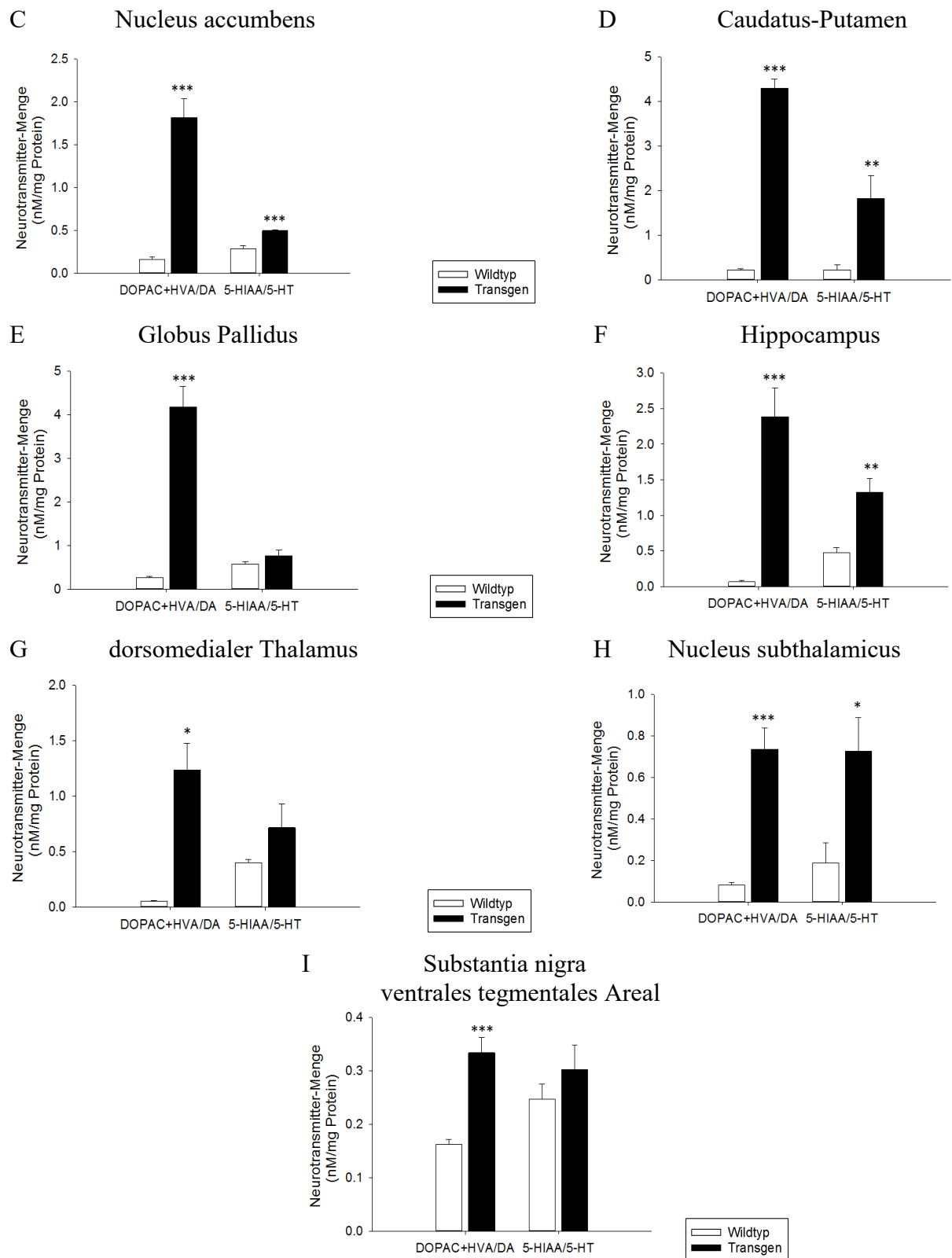
Darüber hinaus wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede in der DAergen bzw. serotonergen-Umsatzrate ermittelt ( $p_{\text{jeweils}} > 0,05$ ).

A medialer präfrontaler Kortex



B orbitofrontaler Kortex





**Abb. 4.4 A-I: Umsatzraten für den Neurotransmitter Dopamin und Serotonin.**

Abgebildet sind die gemittelten Umsatzraten  $\pm$  SEM (in nM/mg Protein) des Neurotransmitters Dopamin (DA) in Bezug auf dessen Metabolite Dihydroxyphenylacetylsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) sowie des Neurotransmitters Serotonin (5-HT) in Bezug auf dessen Metabolit 5-Hydroxyindolylelessigsäure (5-HIAA) in den verschiedenen Gehirnregionen der transgenen Ratten und der Wildtypen. Homozygot:  $n = 6-8$ , Wildtyp:  $n = 6-8$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; nach unabhängigen t-Test bzw. nach Mann-Whitney-U-Test.

### 4.3 Zwanghaftes Kontrollverhalten auf dem offenen Feld

#### 4.3.1 Verhaltensbeobachtung des transgenen Pathologiemodells

Die Auswirkung der genetischen Manipulation auf ein mögliches zwanghaftes Verhalten zeigte sich in dem angewandten Verhaltensparadigma als kein typisch zwanghaftes Kontrollverhalten der transgenen Tiere. Ein derartiges Verhalten bedingt Lokomotion und da diese Tiere zum überwiegenden Teil an bzw. in unmittelbarer Nähe zu einem bestimmten Subareal saßen (Abb. 4.2 D), war eine Auswertung nach den üblichen Kriterien für ein zwanghaftes Kontrollverhalten nicht möglich.

#### 4.3.2 Verhaltensbeobachtung des pharmakologischen Pathologiemodells

Der Effekt der pharmakologischen Behandlung auf ein zwanghaftes Verhalten äußerte sich ab der 5. QNP-Gabe bis zum Ende der Testdauer von 7 Wochen in einem stabilen Phänotyp zwanghaften Kontrollverhaltens chronisch QNP-behandelter Ratten gegenüber ihrer Referenzgruppe ( $p_{\text{jeweils}} < 0,05$ /Abb. 4.5 A).

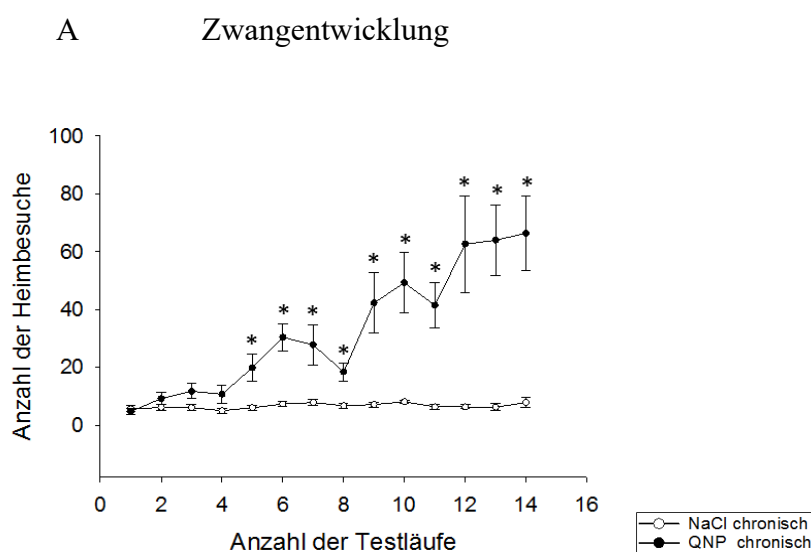
Ferner ergaben sich für die ermittelten Heimbesuche signifikante Haupteffekte [Substanzart:  $F(1,39) = 15,22$ ;  $p < 0,001$ ; Behandlungsdauer:  $F(1,39) = 14,06$ ;  $p < 0,001$ ], welche in den Post-hoc-Testverfahren eine gesteigerte Anzahl an Heimbesuchen der chronisch QNP-behandelten Ratten gegenüber ihre Referenzgruppe (Faktor:  $+6,08$ ;  $p < 0,001$ ) als auch verglichen mit den akut QNP-behandelten Tieren (Faktor:  $+5,87$ ;  $p < 0,001$ ) aufwiesen [Interaktion:  $F(1,39) = 15,81$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.5 B].

Weiterhin zeigte das Verhältnis der beobachteten zu den erwarteten Heimbesuchen signifikante Haupteffekte [Substanzart:  $F(1,38) = 5,14^{(*)}$ ;  $p = 0,030^{(*)}$ ; Behandlungsdauer:  $F(1,38) = 5,96^{(*)}$ ;  $p = 0,020^{(*)}$ ]. In den paarweisen Mittelwertvergleichen wiesen die chronisch QNP-behandelten Tiere eine klare Zunahme dieses Parameter sowohl gegenüber ihrer Referenzgruppe (Faktor:  $+1,73$ ;  $p < 0,001^{(*)}$ ) als auch im Vergleich zu den akut QNP-behandelten Tieren auf (Faktor:  $+1,87$ ;  $p < 0,001^{(*)}$ ), [Interaktion:  $F(1,38) = 10,38^{(*)}$ ;  $p = 0,003^{(*)}$ /Abb. 4.5 C].

Darüber hinaus zeigten sich für den Parameter der Rückkehrzeit deutliche Haupteffekte [Substanzart:  $F(1,37) = 11,52$ ;  $p = 0,002$ ; Behandlungsdauer:  $F(1,37) = 16,5$ ;  $p < 0,001$ ]. In den folgenden Post-hoc-Analysen war die Rückkehrzeit der chronisch QNP-behandelten Tiere zum jeweiligen Heimareal im Vergleich zu ihrer Referenzgruppe deutlich kürzer (Faktor:  $-2,34$ ;  $p < 0,001$ ). Ferner bewirkte die chronische Applikation mit QNP im Vergleich zu der

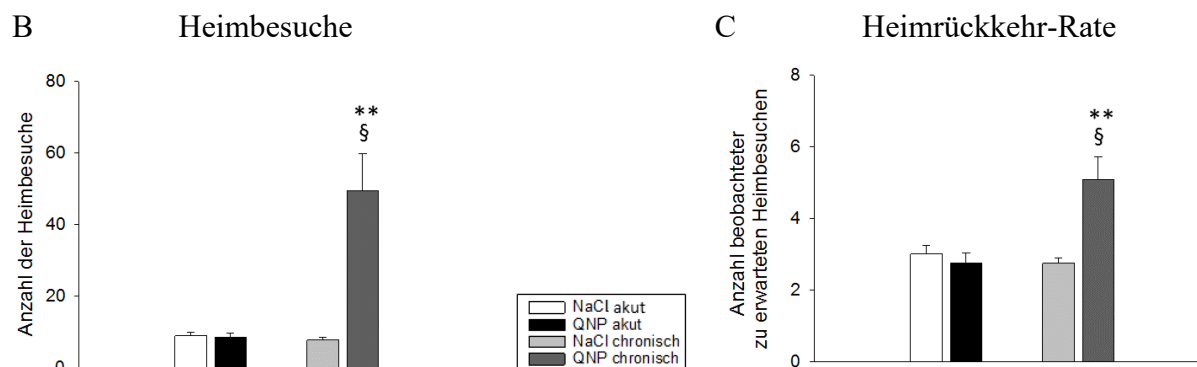
akuten QNP-Gabe eine schnellere Rückkehr zum jeweiligen Heimareal (Faktor: -2,55;  $p < 0,001$ ), [Interaktionseffekt:  $F(1,37) = 10,65$ ;  $p = 0,003$ /Abb. 4.5 D].

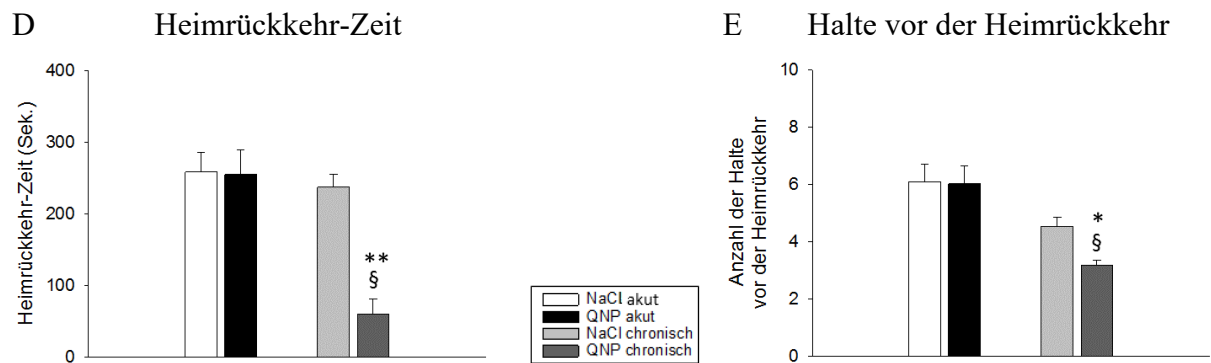
Des Weiteren ergaben sich für die Halte vor der Heimrückkehr ein tendenziell signifikanter Haupteffekt der Substanzart [ $F(1,38) = 3,63^{(*)}$ ;  $p = 0,065^{(*)}$ ] und ein signifikanter Effekt der Behandlungsdauer [ $F(1,38) = 20,62^{(*)}$ ;  $p < 0,001^{(*)}$ ]. Die Post-hoc-Analysen zeigten eine deutlich geringere Anzahl der Zwischenhalte für die chronisch QNP-behandelte Gruppe gegenüber ihrer Referenzgruppe (Faktor: -1,20;  $p = 0,016^{(*)}$ ) als auch gegenüber der akuten QNP-Gruppe (Faktor: -2,00;  $p < 0,001^{(*)}$ ), [Interaktionseffekt:  $F(1,38) = 2,99^{(*)}$ ;  $p < 0,092^{(*)}$  /Abb. 4.5 E].



**Abb. 4.5 A: Repräsentative Darstellung der Entwicklung eines zwanghaften Kontrollverhaltens.**

Abgebildet ist die Entwicklung eines zwanghaften Kontrollverhaltens (Mittelwerte  $\pm$  SEM) chronisch QNP-behandelter Ratten im Vergleich zu ihrer Referenzgruppe am Beispiel der Heimbesuche. Gemessen auf dem modifizierten offenen Feld über die gesamte Testphase von 14 Tagen. NaCl chronisch:  $n = 10$ , QNP chronisch:  $n = 10$ ; \* $p < 0,05$ ; nach Mann-Whitney-U-Test.





**Abb. 4.5 B-E: Zwanghaftes Kontrollverhalten auf dem offenen Feld.**

Abgebildet sind die Mittelwerte der einzelnen analysierten Parameter ( $\pm$  SEM) der akuten und chronischen QNP- bzw. NaCl-behandelten Tiere für ein zwanghaftes Kontrollverhalten. Gemessen auf dem offenen Feld für 30 min. am zehnten (chronisch)/bzw. einzigen (akut) Versuchstag. QNP-bzw. NaCl-Applikation: 0,5 mg/kg Körpergewicht; akute Gruppe: 1 x QNP- bzw. NaCl-Injektion und anschließend einmaligen Testlauf. Chronische Gruppe: 14 x QNP- bzw. NaCl-Injektion und jeweils anschließend Testlauf. NaCl akut: n = 7, QNP akut: n = 5-6, NaCl chronisch: n = 9-10, QNP chronisch: n = 9-10; § = vs. akute QNP-Gruppe mit  $p < 0,001$ ; \* = vs. chronische NaCl-Gruppe mit  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,001$ ; nach Two-way Anova.

## 4.4 Quantitative PCR-Analysen

### 4.4.1 DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des transgenen Pathologiemodells

Da sich bei einem klassisch transgenen Tiermodell die Integration des Fremdgens mittels Mikroinjektion nicht steuern lässt, wurde vorab die Spezifität des Transgens hinsichtlich der neuronalen DAT-Expression mittels qPCR in verschiedenen Organen (Leber, Nebenniere, Herz, Lunge, Gonaden) eines homozygoten männlichen Tieres im Vergleich zu denen eines Wildtypen untersucht. Die getesteten Gewebeproben der genetisch manipulierten Ratte wiesen jedoch keine erhöhte DAT-Rate auf, was auf eine zentralnervöse DAT-Expression schließen ließ (Ergebnisse nicht abgebildet).

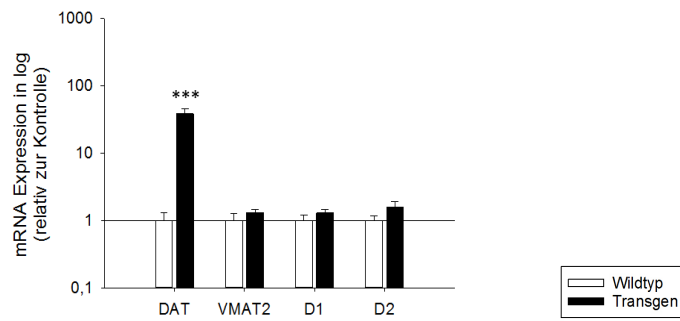
Um die neuronale Überexpression des DAT zu bestätigen und infolge dessen auch mögliche Veränderungen in der Expression des VMAT2 sowie des DRD1 und DRD2 zu überprüfen, wurden die Expressionsraten dieser Zielgene in den einzelnen Arealen des BGTC Regelkreises mittels qPCR analysiert. Wie in den folgenden Abbildungen ersichtlich, war die DAT-Expression in den meisten untersuchten Gehirnregionen der transgenen Ratten signifikant gegenüber den Wildtypen erhöht. Die höchsten DAT-Werte zeigten sich im HPC [Faktor: 9983,76;  $T(14) = 100,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.6 F], im STN [Faktor: +3808,11;  $T(14) = 100,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.6 H], im DM [Faktor: +2213,26;  $T(14) = 100,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.6 G] und im GP [Faktor: +1291,23;  $T(14) = 100,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.6 E]. Zudem wurde eine ebenfalls stark erhöhte DAT-Expression im OFC [Faktor: +535,73;  $T(14) = 100,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.6 B], im NAc [Faktor: +233,76;  $T(14) = 100,00$ ;

$p < 0,001$ /Abb. 4.6 C] und im CPu ermittelt [Faktor: +190,02;  $T(14) = 100,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.6 D]. Vergleichsweise dazu wurde ein mäßig erhöhtes DAT-Level im mPFC gemessen [Faktor: +38,41;  $T(14) = 100,00$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.6 A].

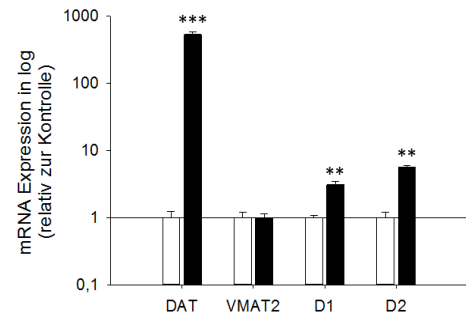
Die Analysen des DRD1 und DRD2 ergaben auf mRNA Ebene ein insgesamt sehr kongruentes Expressionsmuster. Im Vergleich zu den Wildtypen war in den transgenen Ratten sowohl die DRD1- als auch der DRD2-Rate im OFC [DRD1:  $T(14) = 96,00$ ;  $p = 0,002$ , DRD2:  $t(14) = 9,55$ ;  $p < 0,001$ /Abb. 4.6 B] im NAc [DRD1:  $T(14) = 94,00$ ;  $p = 0,005$ , DRD2:  $t(14) = 2,94$ ;  $p = 0,011$ /Abb. 4.6 C] als auch im CPu deutlich erhöht [DRD1:  $T(14) = 92,00$ ;  $p = 0,010$ , DRD2:  $T(14) = 93,00$ ;  $p = 0,007$ /Abb. 4.6 D]. Deren Expressionsstärken stimmten auffällig mit denen der DAT-Expression überein. Dementsprechend war der Anstieg für diese beiden Rezeptortypen im OFC am stärksten (Faktor DRD1: + 3,08; Faktor DRD2: + 5,59), im NAc geringer (Faktor DRD1: + 2,74, Faktor DRD2: + 2,24) und im CPu am schwächsten (Faktor DRD1: + 1,81, Faktor DRD2: + 1,85). Eine signifikante Erhöhung allein auf DRD2-Ebene wurde gegenüber den Wildtypen einzig im HPC [Faktor: + 2,28;  $t(14) = 4,04$ ;  $p = 0,001$ /Abb. 4.6 F] und im STN transgener Ratten quantifiziert [Faktor: + 1,42;  $t(14) = 2,26$ ;  $p = 0,040$ /Abb. 4.6 H].

Überdies wurde der DAT, der DRD1 und der DRD2 in den übrigen Regionen des BGTC Regelkreises in einem ähnlichen Maße wie in den Wildtypen exprimiert. Ferner ergab die Quantifizierung des VMAT2 in keiner der untersuchten Regionen eine statistisch relevante Genexpressionsveränderung ( $p_{\text{jeweils}} > 0,05$ ).

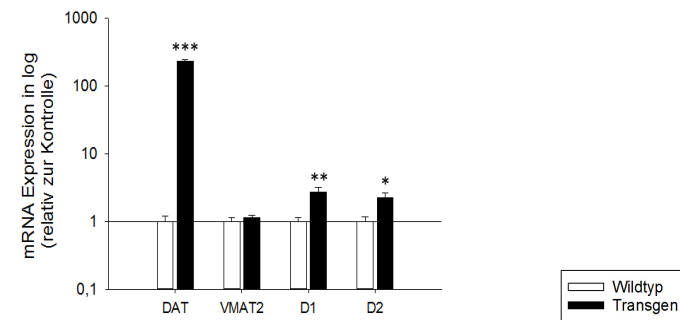
A medialer präfrontaler Kortex



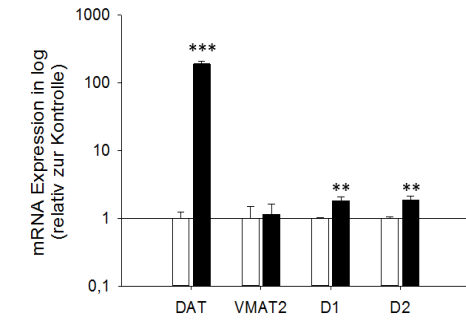
B orbitofrontaler Kortex



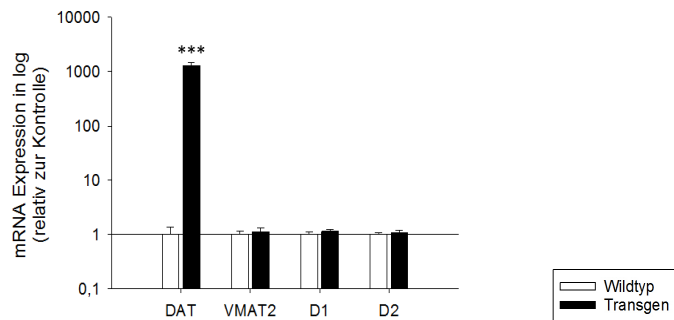
C Nucleus accumbens



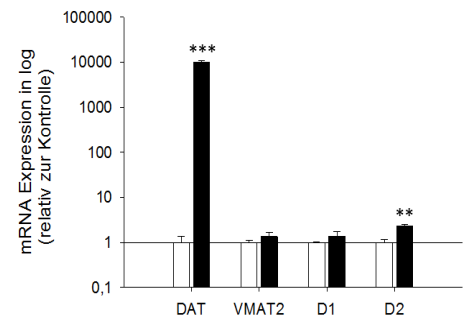
D Caudatus-Putamen



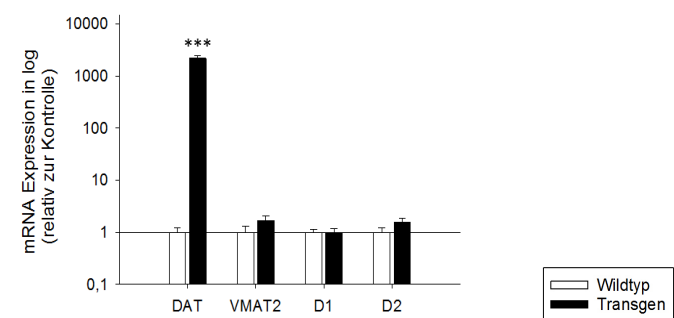
E Globus pallidus



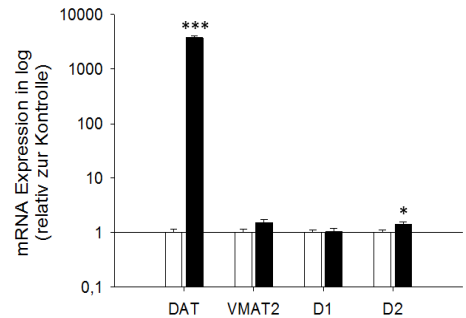
F Hippocampus

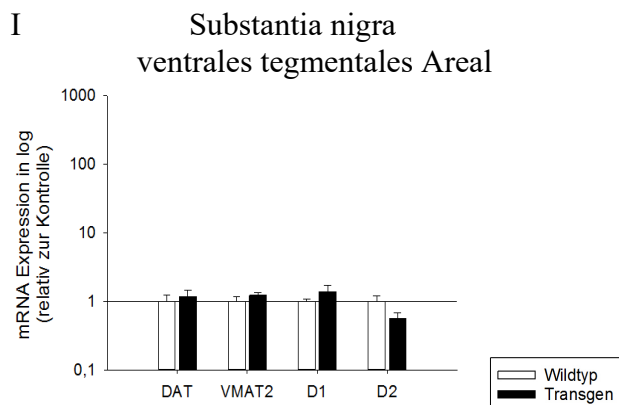


G dorsomedialer Thalamus



H Nucleus subthalamicus





**Abb. 4.6 A-I: mRNA Expressionslevel von DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des transgenen Pathologiemodells.**

Abgebildet sind die relativen mRNA Expressionslevel  $\pm$  SEM (log) des dopaminergen Transporters (DAT), des vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2), des Dopaminrezeptors 1 (D1) und des Dopaminrezeptors 2 (D2) in den verschiedenen Gehirnregionen der transgenen Ratten und der Wildtypen. Die Genexpressionsdaten wurden jeweils gegen die endogene Kontrolle GFAP normalisiert und im Verhältnis zu den Wildtypen dargestellt. Homozygot: n = 8, Wildtyp: n = 8; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; nach unabhängigen t-Test bzw. nach Mann-Whitney-U-Test.

#### 4.4.2 DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des pharmakologischen Pathologiemodells

Die Abbildungen 4.7 A-I zeigen die qPCR-Daten der verschiedenen DA-Rezeptoren (DRD1 und DRD2) und -Transportersysteme (DAT/VMAT2) des BGTC Kreislaufes unter Einwirkung der unterschiedlichen QNP- bzw. NaCl-Behandlungen im pharmakologischen Pathologiemodell.

Die statistischen Auswertungen ergaben im mPFC keine signifikanten Unterschiede für die jeweiligen Gruppen. Im Vergleich zu der chronischen NaCl-Applikation ließ sich für die chronische QNP-Gruppe dennoch eine Hochregulation der DAergen Transportersysteme und des DRD2 erkennen (Abb. 4.7 A).

Ein entsprechendes nicht signifikantes Expressionsmuster mit ebenfalls erhöhter DAT-, VMAT2- und DRD2-Rate wurde im Hippocampus chronisch QNP-behandelter Tiere gegenüber ihrer Kontrollgruppe festgestellt (Abb. 4.7 F).

In der Region des OFC waren ebenfalls keine Signifikanzen zu analysieren. Dennoch war auch hier für die chronisch QNP-behandelten Tiere eine gesteigerte Genexpression der DA-Rezeptoren gegenüber ihrer Referenzgruppe zu erkennen, während im Gegensatz dazu die beiden DAergen Transportersysteme der chronischen QNP-Gruppe eine verminderte Expression im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe zeigten (Abb. 4.7 B).



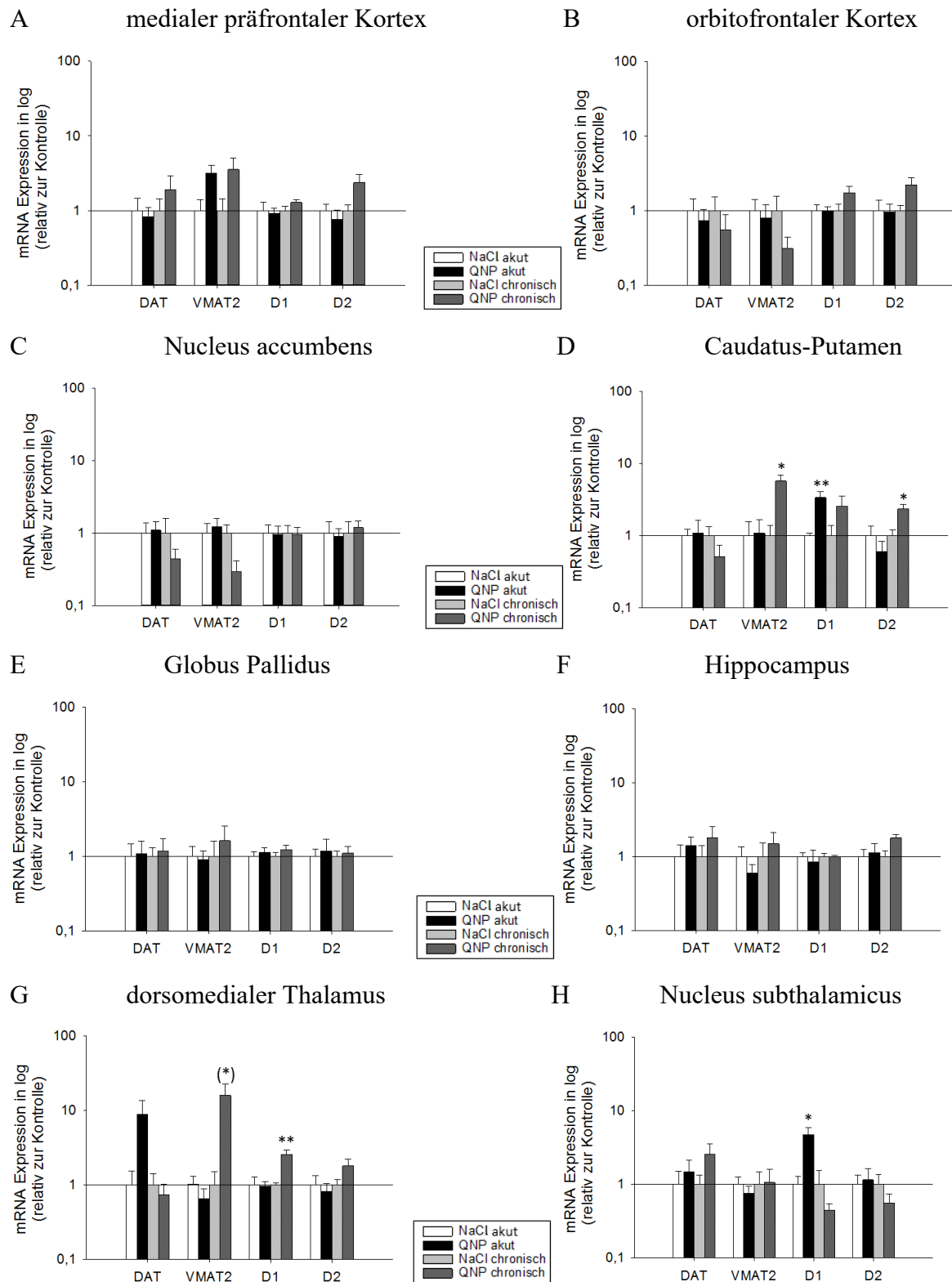
Ein ähnlicher Effekt der chronischen QNP-Gabe mit ebenfalls verminderter, allerdings nicht signifikanter, Genexpression war im Vergleich zu der chronischen NaCl-Gabe für die beiden Transportersysteme im NAc festzustellen (Abb. 4.7 C).

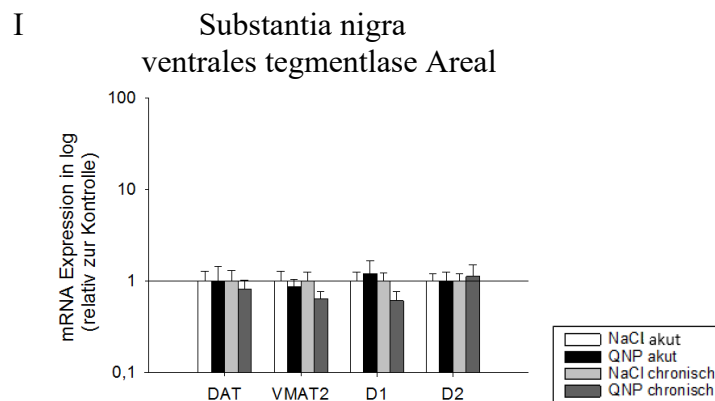
Erste signifikante Effekte zeigten sich im CPu, in dem eine deutliche Hochregulation des DRD1 akut QNP-behandelter Tiere gegenüber ihrer Referenzgruppe zu analysieren war [Faktor: + 3,35;  $T(9) = 15,00$ ;  $p = 0,004$ ]. Dementgegen wiesen die chronischen QNP-Ratten im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe eine klare Zunahme für den DRD2 [Faktor: + 3,22;  $t(8) = -3,09$ ;  $p = 0,015$ ] und den VMAT2 auf [Faktor: + 1,59;  $T(8) = 16,00$ ;  $p = 0,015$ ]. Eine ebenfalls gesteigerte, jedoch nicht signifikante, Genexpressionsrate wurde für den DRD1 chronisch QNP-behandelter Tiere gegenüber ihrer Referenzgruppe festgestellt, während sich für den DAT derselben Gruppen, ebenfalls nicht signifikant, eine Reduktion erkennen ließ (Abb. 4.7 D).

Ferner führte die chronische QNP-Gabe im Vergleich zu der dauerhaften NaCl-Applikation im DM zu deutlichen Genexpressionsanstiegen des DRD1 [Faktor: + 1,55;  $T(8) = 15,00$ ;  $p = 0,008$ ] als auch tendenziell des VMAT2 [Faktor: + 15,8;  $t(8) = -2,20$ ;  $p = 0,058$ ]. Weiterhin ließ sich für dieselben Behandlungsformen erhöhte, jedoch nicht signifikante, DRD2-Werte sowie eine verstärkte, ebenfalls nicht signifikante, Expression des DAT akut QNP-behandelter Ratten gegenüber ihrer Referenzgruppe erkennen (Abb. Abb. 4.7 G).

Zudem ergab sich im STN ein klarer Anstieg des DRD1 bei akuter QNP-Gabe gegenüber der akuten NaCl-Applikation [Faktor: + 1,47;  $T(12) = 36,00$ ;  $p = 0,038$ ]. Ferner war im Vergleich zu den chronischen NaCl-Tieren eine verringerte, allerdings nicht signifikante, DRD1- als auch DRD2-Rate mit wiederum erhöhten, jedoch ebenfalls nicht signifikanten, DAT-Werten chronisch QNP-behandelter Ratten zu erkennen (Abb.4.7 H).

Darüber hinaus waren die Genexpressionsraten der untersuchten Zielgene in der Regionen des GP (Abb. 4.7 E) und der SN/VTA (Abb. 4.7 I) eher unauffällig.





**Abb. 4.7 A-I: mRNA Expressionslevel von DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des pharmakologischen Pathologiemodells.**

Dargestellt sind die relativen mRNA Expressionslevel  $\pm$  SEM (log) des dopaminergen Transporters (DAT), des vesikulären Dopamintransporter 2 (VMAT2) sowie des Dopaminrezeptors 1 (D1) und des Dopaminrezeptors 2 (D2) in den verschiedenen Gehirnregionen des Basalganglien-thalamo-kortikalen Regelkreises des pharmakologischen Pathologiemodells. Die Genexpressionsdaten wurden jeweils gegen die endogene Kontrolle GFAP normalisiert und im Verhältnis zu ihrer Kontrollgruppe dargestellt. NaCl akut: n = 5-8, QNP akut: n = 5-8, NaCl chronisch: n = 5; QNP chronisch: n = 5; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; nach unabhängigen t-Test bzw. Mann-Whitney U-Test.

## 4.5 Protein-Analysen

### 4.5.1 TaqMan®-Protein-Expression-Assay-Methode

Als Grundvoraussetzung einer erfolgreichen TPA-Analyse wurden zunächst die Antikörper-Antigen-Bindungseigenschaften der nach dem Forced Proximity Probe-Test selektierten Antikörpern im Western-Blot überprüft. Am Beispiel einer biologischen Positiv-Probe (1/4 naives Rattengehirn) wurde jeweils ein durchweg eindeutiges Ergebnis im Bereich der zu erwarteten molekularen Bandengröße dokumentiert und diese Antikörper folglich für die weitere Etablierung der TPA-Methode eingesetzt (Abb. S1).

In der späteren Proteinbestimmung ermöglichte die neuartige Analytik-Methode unter Verwendung der oben genannten Antikörper und einer ausreichenden Menge an Gewebe (1/4 naives Rattengehirn) lediglich in Bezug auf den DAT-AK der Firma Abnova verwertbare Ergebnisse (Abb. S2). Letztendlich stellte sich diese Art zur Protein-Quantifizierung der einzelnen Gewebeproben allerdings auch nach einer Vielzahl verschiedener Optimierungsschritte als unzureichend heraus (Tab. S1). So erzielte bzw. überschritt auch in der SN/VTA-Stanze, als die nach den qPCR Ergebnissen mengenreichste DAT-Gewebeprobe naiver Tiere, den für die Datenauswertung notwendigen Schwellenwert von  $\Delta C_T \geq 3$  nicht (Abb. S2).

#### 4.5.2 DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des transgenen Pathologiemodells

Die immunoreaktiven Signale lagen für die einzelnen Gewebeproben ausnahmslos unterhalb der Detektionsgrenze des Western-Blot-Verfahrens (Ergebnisse nicht abgebildet). Die Proteinbestimmung wurde daher, basierend auf den qPCR Ergebnissen und der anatomischen und funktionellen Zugehörigkeit der einzelnen BGTC-Strukturen, an den zusammengeführten kortikalen- (getrennt in: mPFC und OFC), striatalen- (getrennt in: NAc und CPu) und subkortikalen- (getrennt in: GP, DM und STN) Gewebeproben über die durchweg positiven Chemilumineszenz-Signale vorgenommen (Abb. 4.8 D-F).

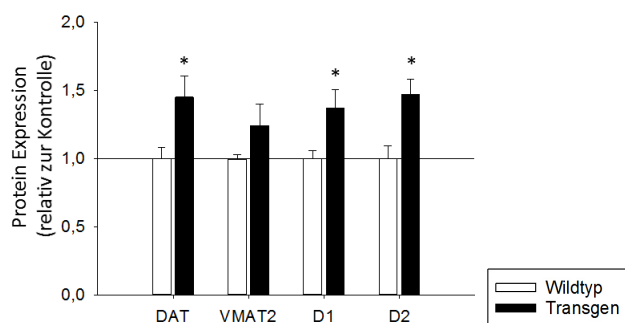
Für die kortikalen Areale wiesen die transgenen Tiere gegenüber den Wildtypen einen deutlich höheren Proteingehalt des DAT [+ 45 %;  $t(8) = -2,58$ ;  $p = 0,033$ ] sowie des DRD1 [+ 37%;  $t(8) = -2,55$ ;  $p = 0,039$ ] und des DRD2 auf [Faktor: + 47%;  $t(8) = -3,17$ ;  $p = 0,013$ ] (Abb. 4.8 A).

Die Auswertung der striatalen Areale ergab vergleichsweise stärkere Expressionszunahmen. Im Vergleich zu den Wildtypen zeigten die transgenen Ratten ein um 67 % erhöhter DAT-Wert [ $t(8) = -5,77$ ;  $p < 0,001$ ], eine um 69 % gesteigerter DRD1- [ $t(8) = -3,61$ ;  $p = 0,007$ ] und ein um 72 % stärkere DRD2-Zunahme [ $t(8) = -3,13$ ;  $p = 0,014$ ] sowie einen um 38 % erhöhten VMAT2-Proteingehalt [ $t(8) = -2,44$ ;  $p = 0,0408$ ] (Abb. 4.8 B).

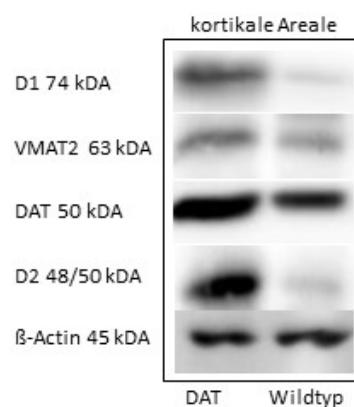
Weiter wurde in den subkortikalen Arealen der transgenen Ratten ein um 59 % verstärkter DAT-Wert [ $t(8) = -2,74$ ;  $p = 0,025$ ] mit tendenziell erhöhter DRD2-Rate [ $t(8) = 2,29$ ;  $p = 0,051$ ] gegenüber den Wildtypen gemessen (Abb. 4.8 C).

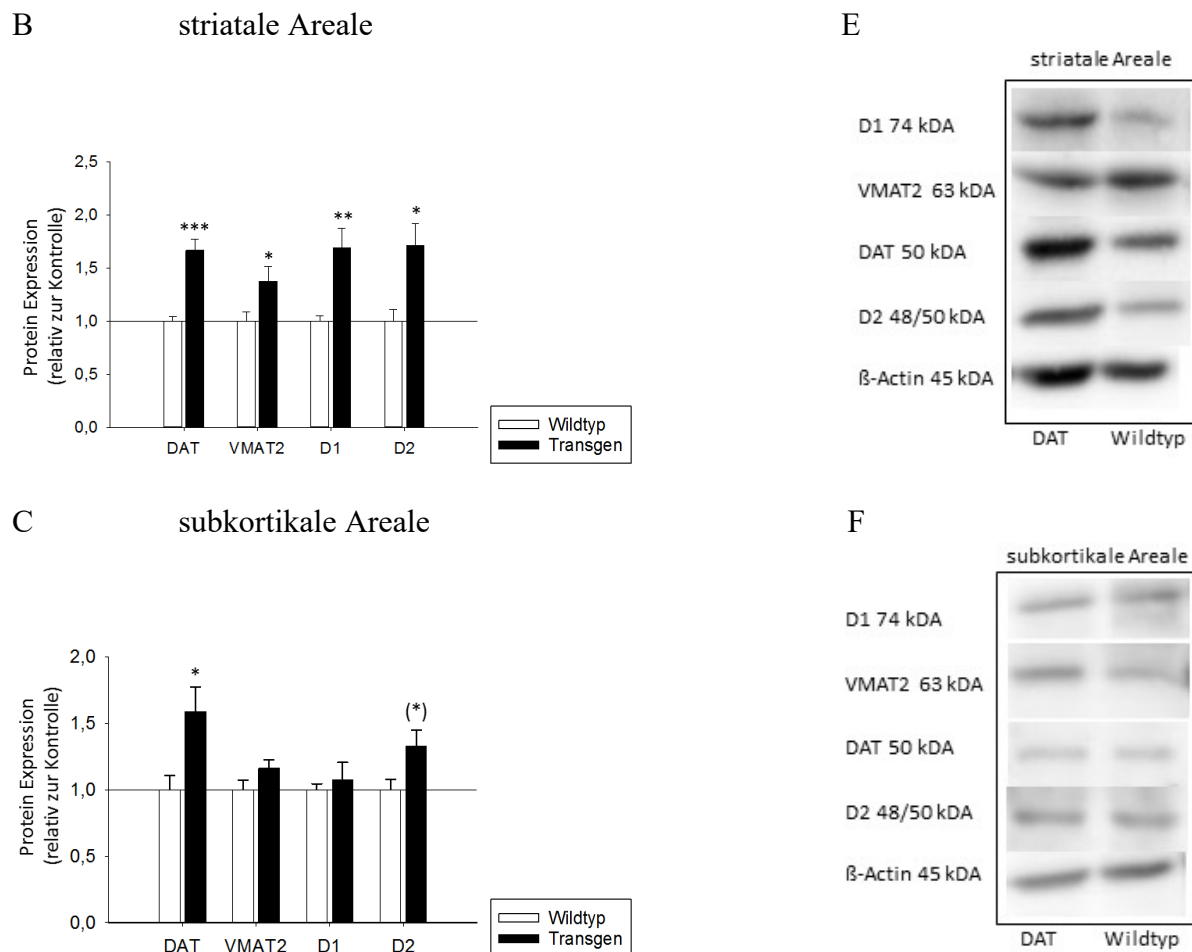
Darüber hinaus wurden für die untersuchten Zielproteine keine weiteren statistisch signifikanten Unterschiede gemessen ( $p_{\text{jeweils}} > 0,05$ ).

A kortikale Areale



D





**Abb. 4.8 A-F: Protein Expression von DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des transgenen Pathologiemodells und repräsentative Immunoblots.**

**Abb. A-C:** Abgebildet sind die relativen Proteinmengen  $\pm$  SEM des dopaminergen Transporters (DAT), des vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2), des Dopaminrezeptors 1 (D1) und des Dopaminrezeptors 2 (D2) in den in den kortikalen- (getrennt in medial präfrontalen Kortex und orbitofrontalen Kortex), striatalen- (getrennt in Nucleus accumbens und Caudatus-Putamen) und subkortikalen- (getrennt in: Globus Pallidus, dorsomedialer Thalamus und Nucleus subthalamicus) Arealen der verschiedenen Gehirnregionen der transgenen Ratten und der Wildtypen. Die Daten wurden jeweils gegen die endogene Kontrolle  $\beta$ -Actin normalisiert und im Verhältnis zu den Wildtypen dargestellt. Homozygot:  $n = 5$ , Wildtyp:  $n = 5$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; nach unabhängigen t-Test. **Abb. D-F:** Repräsentative Immunoblots 10 %iger SDS-Gele nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteinprodukte der kortikalen- striatalen- und subkortikalen-Areale, die unter Verwendung der jeweiligen Antikörper mittels Western-Blot erzeugt wurden.

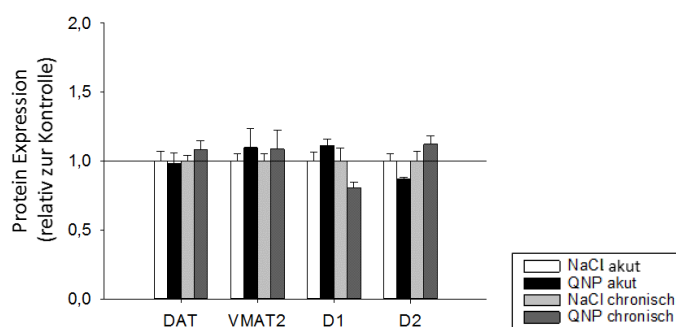
#### 4.5.3 DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des pharmakologischen Pathologiemodells

Die zusätzlich durchgeführten Proteinanalysen des pharmakologischen Pathologiemodells ergaben ebenfalls für die einzelnen Gewebeproben des BGTC Regelkreises durchweg kein zu verwertendes Chemilumineszenz-Signal (Ergebnisse nicht abgebildet), sodass die Auswertung wie im transgenen Pathologiemodell an den immunoreaktiven Signalen der kortikalen- (getrennt in: mPFC und OFC), striatalen- (getrennt in: NAc und CPu) und subkortikalen- (getrennt in: GP, DM und STN) Gewebeproben vorgenommen wurde (Abb.

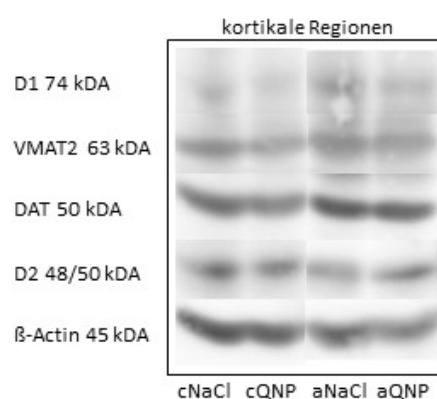
4.9 D-F). Für dieses Pathologiemodell zeigten sich nur in den striatalen Arealen deutliche Unterschiede und hierbei wiederum nur in der chronischen Behandlungsdauer. Demnach führte die chronische QNP-Gabe im Gegensatz zu der chronischen NaCl-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme des DAT [- 12 %;  $t(8) = 2,45$ ;  $p = 0,039$ ], des VMAT2 [- 30 %;  $T(8) = 40,00$ ;  $p = 0,008$ ] als auch des DRD2 [- 17 %;  $t(8) = 3,15$ ;  $p = 0,014$ ] (Abb. 4.9 B).

Darüber hinaus war die DRD1-Rate der striatalen Areale sowie der Gehalt der Zielproteine in den kortikalen- (Abb. 4.9 A) und subkortikalen Arealen (Abb. 4.9 C) statistisch nicht signifikant ( $p_{\text{jeweils}} > 0,05$ ).

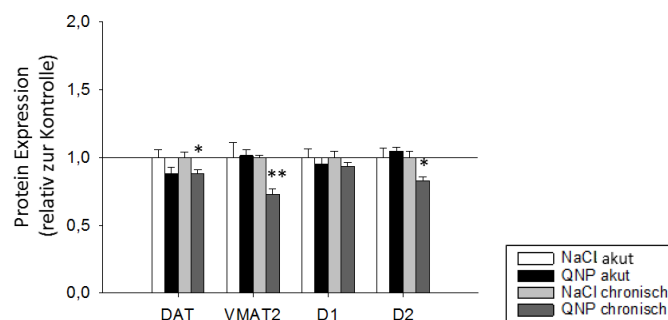
A kortikale Areale



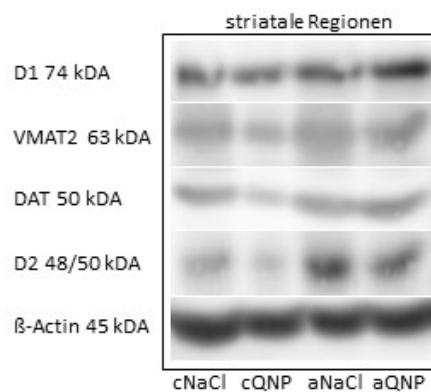
D

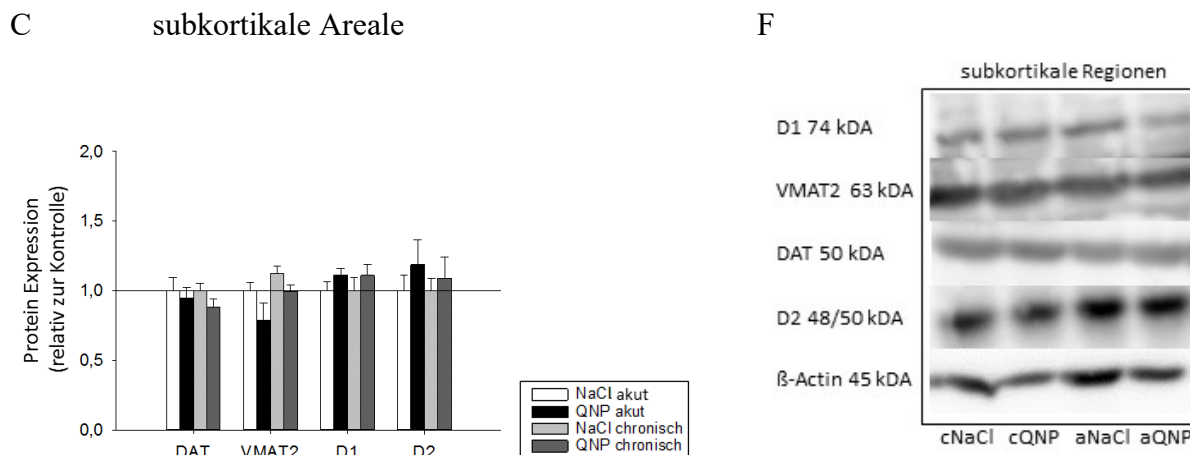


B striatale Areale



E





**Abb. 4.9 A-F: Protein Expression von DAT, VMAT2, DRD1 und DRD2 des pharmakologischen Pathologiemodells und repräsentative Immunoblots.**

**Abb. A-C:** Abgebildet sind die relativen Proteinmengen  $\pm$  SEM des dopaminergen Transporters (DAT), des vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2), des Dopaminrezeptors 1 (D1) und des Dopaminrezeptors 2 (D2) in den in den kortikalen- (getrennt in medial präfrontalen Kortex und orbitofrontalen Kortex), striatalen- (getrennt in Nucleus accumbens und Caudate-Putamen) und subkortikalen- (getrennt in: Globus Pallidus, dorsomedialer Thalamus und Nucleus subthalamicus) Arealen des Basalganglien-thalamo-kortikalen Regelkreiseses der pharmakologisch behandelten Ratten. Die Daten wurden jeweils gegen die endogene Kontrolle  $\beta$ -Actin normalisiert und im Verhältnis zu der jeweiligen Kontrollgruppe dargestellt. NaCl akut (aNaCl):  $n = 5$ , QNP akut (aQNP):  $n = 5$ , NaCl chronisch (cNaCl):  $n = 5$ , QNP chronisch (cQNP):  $n = 5$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; nach unabhängigen t-Test bzw. nach Mann-Whitney-U-Test. **Abb. D-F:** Repräsentative Immunoblots 10%iger SDS-Gele nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteinprodukte der kortikalen-striatalen- und subkortikalen Areale, die unter Verwendung der jeweiligen Antikörper mittels Western-Blot erzeugt wurden.

## 5. Diskussion

In Zusammenhang mit repetitiven Erkrankungen, wie beispielsweise in der Zwangsstörung oder dem Tourette-Syndrom repräsentiert, wird als neurochemisches Korrelat ein dysregulatives DA-System innerhalb des BGTC Regelkreises postuliert, welches unter anderem in einer Überfunktion des DAT begründet sein könnte.

Die vorliegende Arbeit untersuchte vergleichend anhand zweier Pathologiemodelle mit einerseits einer endogenen und andererseits einer exogenen Manipulation des dopaminergen Systems die pathophysiologische Relevanz eines abnormen DA-Systems innerhalb der einzelnen Kerngebiete der BGTC Regelschleife in der Induktion zwanghaften/repetitiven Verhaltens.

Im Einzelnen zeigten die Daten dieser Studie, dass sowohl die Überexpression des DAT als auch die chronische Applikation von QNP zwanghaftes Verhalten induzierte, welches sich jedoch in seiner Ausgestaltung unterschied. Im Gegensatz zu dem perserverativen Verhalten der transgenen Tiere zeigten die chronisch QNP-behandelten Tiere ein zwanghaftes Kontrollverhalten. Den verschiedenen zwanghaften Phänotypen lagen unterschiedliche neurobiologische Veränderungen innerhalb des BGTC Systems zugrunde.

Unter diesen wiesen die transgenen Tiere mit nahezu regionsübergreifender DAT-Überexpression besonders in den striatalen Arealen eine erhöhte Genexpressionsrate des VMAT2 sowie des DRD1 und des DRD2 auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich für die chronisch QNP-behandelten Tiere in den striatalen Arealen eine Reduktion des DAT, des VMAT2 und des DRD2.

Zudem war bei den transgenen Tiere ein nahezu regionsübergreifender DA-Mangel, ein gesteigerter DA-Metabolismus mit regionsabhängigem Serotonin-Defizit sowie ein verändertes GABA-Level festzustellen, während die chronischen QNP-Ratten in den striatalen Regionen einen reduzierten DA-Umsatz aufwiesen.

### 5.1 Auswirkungen der unterschiedlichen dopaminergen Manipulationen auf die molekularbiologische Ebene und den Neurotransmitterhaushalt

#### 5.1.1 Effekte der DAT-Überexpression auf das DA-System

Die transgenen Tiere mit nahezu regionsübergreifender Überexpression des DAT wiesen in beinahe allen untersuchten Arealen eine Reduktion des DA-Levels auf. Ferner wurde in den



striatalen Arealen eine verstärkte Expression des VMAT2, des DRD1 und des DRD2 analysiert, während auf kortikaler Ebene ebenfalls eine Hochregulation dieser beiden Rezeptortypen quantifiziert wurde, welche den qPCR Ergebnissen zufolge wahrscheinlich im OFC begründet sind. Insgesamt korrelierte die Stärke der DAT-Überexpression dabei negativ mit der DA-Konzentration und wiederum positiv mit der Genexpression der beiden DA-Rezeptortypen.

Eine erhöhte DAT-Dichte ist an eine gesteigerte DAT-Aktivität mit einer erhöhten DA-Aufnahme gekoppelt (Mash et al., 2002; Gulley und Zhaniser, 2003; Zahniser und Sorkin, 2004; Salahpour et al., 2008). Diese Veränderungen beeinflussen direkt die postsynaptische Signalweiterleitung, indem nicht nur die Menge an extrazellulären DA herabgesetzt wird, sondern auch dessen Verweildauer an der Synapse verkürzt ist. Zudem wird eine stark direkt wirkende reziproke Interaktion des DAT und der prä- und postsynaptischen DA-Rezeptoren beschrieben, in der ein gesteigertes DAT-System die Hochregulation der DA-Rezeptoren bedingt, während eine behandlungsabhängige Stimulation dieser Rezeptoren hauptsächlich in einer erhöhten DAT-Aktivität resultiert (Gulley und Zahniser, 2003; Kimmel et al., 2003; Ghisi et al., 2009).

In transgenen Tieren wurde hierzu die DRD2-Dichte und deren Sensitivierung reflektorisch über einen D2 vermittelten Prozess mittels Bestimmung des phospho-Akt-Levels untersucht (Beaulieu et al., 2007). Von dieser Arbeitsgruppe wird dazu passend in ihrer DAT überexprimierenden Maus über einen erhöhten phospho-Akt Spiegel berichtet, während in ihrer DAT-knockout (KO) Maus eine verminderter phospho-Akt-Level beschrieben wird (Beaulieu et al., 2004; Ghisi et al., 2009). Ferner finden sich in der DAT überexprimierenden Maus eine erhöhte DRD1/DRD2-Dichte (Ghisi et al., 2009) und ein verringerter extrazellulärer DA-Spiegel (Salahpour et al., 2008), während in der DAT-KO Maus reduzierte DRD1/DRD2-Werte (Giros et al., 1996) mit erhöhten extrazellulären DA-Spiegel nachgewiesen sind (Jones et al., 1998).

Demnach kann die Überexpression des DAT im vorliegenden transgenen Pathologiemodell den beschriebenen DA-Mangel bedingen und die Hochregulierung der beiden Rezeptortypen induzieren, um so die anhaltende Homöostase über eine erhöhte Genexpression und mögliche Sensitivierung der DA-Rezeptoren postsynaptischer Neurone zu gewährleisten.

Die Bestimmung der DA-Konzentration erfolgte an Gewebe-Homogenaten und erlaubt daher zwar keine Unterscheidung zwischen extra- und intrazellulärem DA. Dennoch kann, neben der Tatsache der DAT-Überexpression, davon ausgegangen werden, dass die verstärkte

Expression der wahrscheinlich vorzugsweise postsynaptischen DRD1/DRD2 auf einen verminderten tonischen DA-Spiegel zurückzuführen ist und in einer möglichen Sensitivierung dieser beiden Rezeptortypen resultiert. Diese physiologischen Bedingungen könnten indirekt über den negativen Rückkopplungsmechanismus der präsynaptischen D2-Autorezeptoren (Gulley und Zahniser, 2003) die Freisetzung des möglicherweise verstärkt angereicherten perisynaptischen DA aus den Vesikeln der Präsynapse bedingen (Salahpour et al., 2008).

Wie bereits in der Einleitung zur DAergen Neurotransmission erläutert, wird das aus dem synaptischen Spalt zurücktransportierte DA entweder über den VMAT2 erneut in die Vesikel verpackt und zur weiteren Ausschüttung aus den Axonterminalen bereitgestellt oder enzymatisch zu DOPAC und HVA metabolisiert (Eisenhofer et al., 2004).

Die molekularbiologischen Untersuchungen der transgenen Tiere ergaben für den VMAT2 lediglich einen Anstieg in den striatalen Arealen, sodass sich die Ausschüttung eines vermehrt angereicherten phasischen DA aus den präsynaptischen Vesikeln in diesen Arealen vermuten lässt. Dieses Überangebot an phasischen DA der Basalganglieneingangsstrukturen könnte über die potentiell sensitiveren DRD1 des direkten Weges in einer Desinhibition der Kortexstrukturen resultieren und die Induktion zwanghaften/repetitiven Verhaltens bedingen (Saxena et al., 1998; Lacerda et al., 2003).

### **5.1.2 Effekte der DAT-Überexpression auf den Neurotransmitter 5-HT**

Wie den biochemischen Daten zu entnehmen ist, zeigten sich neben den Veränderungen auf DAerger Ebene ebenfalls Alternationen im Serotonin-System. Hierunter war sowohl ein reduziertes Serotonin-Level im OFC, im HPC und im DM zu verzeichnen als auch eine erhöhte serotonerge Umsatzrate im mPFC, im OFC, im NAc, im CPu, im HPC und im STN.

Angesichts der engen Interaktion des DAergen- und serotonergen Systems ist dies nachvollziehbar (Di Giovanni, 2008; Wood und Wren, 2008). Anatomisch ist beispielsweise in den Zielgebieten der DAergen Nervenfasern und dabei besonders im Striatum eine hohe Dichte serotonerger Synapsen angesiedelt (Marsden, 1991). Funktional führt die neurotoxische Läsion des mesostriatalen Systems durch 6-hydroxydopamin Hydrochlorid nicht nur zu einem Untergang DAerger Neurone in dem Bereich der Läsion, sondern hauptsächlich auch zu einer verminderten serotonergen Innervation mit konsekutiv reduzierten Serotonin-Spiegel und einer erhöhten serotonergen Umsatzrate im Striatum (Takeuchi et al., 1991; Karstadt et al., 1994; Guiard et al., 2008).

Die hohe klinische Komorbidität zwischen DA-Mangelerkrankungen wie der Zwangsstörung und der Depression ist unter diesen Aspekten insgesamt nachvollziehbar (Besiroglu et al., 2007; Brady 2014;), zumal Zwangserkrankungen in der Pharmakotherapie primär über selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer therapiert werden (Pizarro et al., 2014). Zusammengenommen scheint daher das dysfunktionale DA-System innerhalb des BGTC Regelkreises sekundär auch zu lang anhaltenden Veränderungen im Serotonin-System dieser Tiere zu führen.

### **5.1.3 Effekte der DAT-Überexpression auf den Neurotransmitter GABA**

Neben dem veränderten DA- und Serotonin-Spiegel wurde in den biochemischen Untersuchungen der transgenen Tiere ein verringertes GABA-Level in den Regionen des mPFC und des DM gemessen, während im Gegensatz dazu ein Anstieg desselben Neurotransmitters in den Strukturen des CPu und des GP analysiert wurde.

Neben der oben genannten Wechselwirkung des serotonergen- und DAergen Systems besteht innerhalb der BGTC Regelschleife ebenfalls eine reziproke Verschaltung zwischen dem DA-System und der GABAergen Neurotransmission (Tzschentke, 2001; Nikolaus et al., 2010).

Die stimulierende Eigenschaft von DA auf den inhibitorischen Neurotransmitter GABA gründet dabei auf der Erkenntnis, dass Parkinson-Patienten auf Grund ihres DA-Mangels oftmals eine abnorme Oszillationsaktivität innerhalb bestimmter Areale des BGTC Regelkreises aufweisen (Bergman et al., 1998; Uhlhaas und Singer, 2006; Hammond et al., 2007). Hierunter wird eine verstärkte Oszillation des beta-Frequenzbandes vor allem in Zusammenhang mit einer Störung der willkürlichen Bewegungsabläufen gebracht (Sanes und Donoghue, 1993; Baker 2007).

Der regionsübergreifende DA-Mangel dieser Tiere scheint sich aufgrund der Interaktion beider Neurotransmittersysteme gerade in den vorherrschenden GABAergen Projektionsbahnen des CPu und des GP in einer Erhöhung des GABA-Spiegels und in den vorherrschenden glutamatergen Projektionsbahnen des mPFC und des DM in einem reduzierten GABA-Spiegel niederzuschlagen. Konsistent hierzu zeigten die *in vivo* Ableitungen der heterozygoten Tiere dieses Pathologiemodells mit ebenfalls reduziertem DA-Spiegel (persönliche Mitteilung: AG Winter C.; Wieske F.) eine erhöhte Oszillation im beta-Frequenzband des mPFC, des NAc und des STN (persönliche Mitteilung: AG Winter C.; Avchalumov Y.).

#### **5.1.4 Effekte der DA-Rezeptor vermittelten Manipulation auf molekularbiologischer Ebene DAerger Einheiten**

Die Ergebnisse der Western-Blot Analysen ergaben in den striatalen Arealen der chronisch QNP-behandelten Gruppe einen deutlich reduzierten Proteingehalt des DAT, des VMAT2 und des DRD2. Angesichts der detaillierteren Darstellungen der qPCR spiegeln sich die Veränderungen der beiden Transportersysteme hauptsächlich im NAc wider. Dementgegen zeigte sich in der qPCR Analyse für den DRD2 gerade in der Region des Caudatus-Putamen ein anderes Expressionsmuster mit signifikant erhöhtem Wert. Dieses inkongruente Ergebnis beider molekularbiologischen Quantifizierungsmethoden ist womöglich das Resultat der unterschiedlichen translationalen Regulationsschritte innerhalb der Genexpression, wie beispielsweise die mRNA-Degradation, die Translationsinhibition über microRNAs, RNA-Interferenzen oder antisense-RNAs. (Filipowicz et al., 2008; Jinek und Doudna, 2009; Chiba 2014), sodass sich die Menge an DNA und fertigem Proteinprodukt nicht immer entsprechen müssen.

Angesichts der Phänotypinduktion mittels eines D2-vermittelten Prozesses kann die verminderte DRD2-Dichte als Neuroadaption auf dessen persistente Stimulation angesehen werden. In Übereinstimmung dazu ist in tierexperimentellen Untersuchungen unter chronischer DA-Stimulation mittels QNP, Kokain oder Amphetamin (Subramaniam et al., 1992; Ginovart et al., 1999; Nader et al., 2002, 2006), sowie in klinischen Studien zwangserkrankter Patienten (Denys et al., 2004b, 2013; Perani et al., 2008, Nikolaus et al., 2010;) ebenfalls eine Abnahme der DRD2-Werte nachgewiesen. Die Reduktion dieses Rezeptorsubtyps legt folglich eine Desensitivierung infolge der dauerhaften QNP-Gabe nahe (Leaney et al., 2004; Nimitvilai et al., 2014; Beaulieu et al., 2015). Neben der selektiven agonistischen Wirkung auf die DRD2/DRD3 Rezeptoren wirkt QNP ebenfalls über die negative Rückkopplungsschleife der D2-ähnlichen DA-Autorezeptoren auf die weitere DA-Ausschüttung und -Synthese hemmend (O'Hara et al., 1996; Koeltzow et al., 2003; Schmitz et al., 2003). Als effiziente Reaktion auf diese möglicherweise dauerhaft verminderte tonische DA-Konzentration in den striatalen Strukturen kann der herabgesetzte DAerge Metabolismus in diesen Regionen (persönliche Mitteilung: AG Winter C.; Wieske F.) vermutet werden, um so die Homöostase zu gewährleisten.

Neben der Metabolismusrate reguliert überwiegend der DAT den extrazellulären DA-Spiegel (Giros und Caron, 1993, Torres et al., 2003). Wie bereits erwähnt, wird dieser sowohl indirekt über den negativen Rückkopplungsmechanismus der D2-Autorezeptoren als auch direkt über

DA selbst reguliert. (Gulley und Zahniser, 2003). Zur Aufrechterhaltung der DA-Homöostase könnte das DA-System das potentielle Defizit an tonischen DA innerhalb der striatalen Areale über eine verminderte Genexpression des DAT auszugleichen versuchen. Dieser Mechanismus würde die Verweildauer im synaptischen Spalt erhöhen, worüber eventuell eine physiologische DA-Konzentration erreicht werden könnte. Wie bereits in der Einleitung ausführlich erläutert, wird in Studien der Zwangsstörung zum überwiegenden Teil von einer erhöhten DAT-Rate gesprochen, dennoch sind die Befunde nicht einheitlich, sodass beispielsweise in einer Untersuchung an zwangserkrankten Patienten ein reduzierter DAT-Spiegel beschrieben ist (Hesse et al., 2005).

Weiterhin scheint, als Folge des verminderten Rücktransports an extrazellulären DA, der VMAT2 ebenfalls in seiner Genexpression herabreguliert. In Zusammenhang dazu wird in einer Studie von Sossi und Mitarbeitern (2010) in einem Tiermodell der Parkinson-Erkrankung bei 4-wöchiger Gabe des DRD2/DRD3 Agonisten Pramipexol ebenfalls eine reduzierte vesikuläre DA-Aufnahme entgegen einer erhöhten bei der Behandlung mit der DA-Vorstufe L-3,4-Dihydroxyphenylalanin dokumentiert.

Im Gegensatz zu den Veränderungen der unterschiedlichen DA-Einheiten der chronischen QNP-Applikation zeigte die akute QNP-Gabe, entgegen einiger Studien zur akuten DA-Stimulation mittels unterschiedlicher Psychostimulanzien (Brown et al., 2001; Daws et al., 2002; Truong et al., 2004a, 2004b), keinerlei molekularbiologische Veränderungen. Dieser Umstand könnte einerseits auf die geringere QNP-Dosis von nur 0,5 mg/kg Körpergewicht zurückgeführt werden und andererseits in der Tatsache begründet sein, dass QNP im Gegensatz zu Kokain oder Amphetamin keinen tatsächlich endogen erhöhten DA-Spiegel darstellt.

## **5.2 Verhaltenscharakterisierungen der beiden Pathologiemodelle**

### **5.2.1 Allgemeine Aspekte des transgenen Pathologiemodells**

Die in Kooperation generierten transgenen Ratten zeigten nach den ersten heterozygoten Verpaarungen ein nach den Mendel'schen Vererbungsgesetzen zu erwartendes Verteilungsmuster des Genotyps. Die Wurfgrößen und Sterblichkeitsraten der homozygoten Tiere waren gegenüber den Wildtypen vergleichbar.

Die genetische Manipulation führte allerdings bei den weiblichen homozygoten Tieren zu einer erheblich verringerten Fruchtbarkeit (1-2 Würfe pro Tier) und fehlendem

Brutpflegeverhalten. Nestbau, Zurückbringen des Nachwuchses, Wärmen und Säugen der Jungtiere konnten hierunter nicht beobachtet werden.

Der Grund hierfür könnte in der Beteiligung des DAergen-Systems bei bestimmten endokrinologischen Prozessen innerhalb des tuberoinfundibulären Regelkreises liegen (Dahlström und Fuxe, 1964; Björklund und Dunnett, 2007). Die DAergen Neurone des Nucleus infundibularis, einem Kern des Hypothalamus, ziehen zur Eminentia mediana des Hypophysenstiels. Dieser setzt über seine Axonendigungen DA in Richtung des Pfortadersystems der Hypophyse frei und hemmt über die D2-Rezeptoren im Hypophysenvorderlappen vor allem die Ausschüttung von Prolaktin (Fitzgerald und Dinan, 2008). Prolaktin reguliert das Brustdrüsenwachstum während der Schwangerschaft, die Milchsekretion während der Stillzeit, die Fruchtbarkeit und das Brutpflegeverhalten (Freeman et al., 2000). Ist die Wirkung von DA herabgesetzt, ist die Produktion von Prolaktin ungebremsst und es kommt zum Prolaktinüberschuss. Prolaktin hemmt wiederum die Sekretion des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) aus dem Hypothalamus. Eine niedrige Konzentration dieses Botenstoffes bedingt wiederum eine geringe Freisetzung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) als auch des luteinisierenden Hormons (LH) aus dem Hypophysenvorderlappen, welche die Keimzellbildung und die gonadale Steroid-Synthese anregen (Freeman et al., 2000).

Das überaktive DAT-System mit reduzierten DA-Spiegel könnte daher einen Prolaktinüberschuss bedingen, welcher infolge der konsekutiv reduzierten Sexualhormone zu Störungen in der Ovulation und dem Brutpflegeverhalten führt und die geringe Trächtigkeit der weiblichen Tiere sowie die notwendige Ammenaufzucht erklären.

Das Kleintierscreening zeigte zudem bei dem weiblichen homozygoten Tier einen erniedrigten ACTH-Wert mit erhöhten Cortisolspiegel und verringerten Schilddrüsen-Werten (T3/T4), welche zusammen mit der vergrößerten Nebenniere auf eine dysfunktionale Stressachse und eine Schilddrüsenunterfunktion (Hypothyreose) hinweisen.

Neben der direkten Suppression auf die Prolaktinfreisetzung wirkt DA ebenfalls indirekt hemmend auf die Cortisolbildung (Deetjen und Speckmann, 1994). Die Cortisolproduktion wird über die Ausschüttung des ACTHs aus dem Hypophysenvorderlappen reguliert und mittels DA gehemmt, wodurch der Cortisolgehalt in der Nebennierenrinde gesenkt wird (Deetjen und Speckmann, 1994). Aufgrund des verminderten DA wäre daher ein erhöhter ACTH-Wert mit einem erhöhtem Cortisolspiegel zu erwarten. Die verstärkte Cortisolproduktion dieser Tiere wird wegen des reduzierten ACTH-Spiegels, womöglich wie

beim adrenalen Cushing-Syndrom, ACTH-unabhängig und somit DA-ungebunden durch die beschriebenen vergrößerten Nebennieren potentiell Tumorzellen des Zielorgans selbst verursacht (Orth, 1995), wenngleich hierzu auch die entsprechenden Untersuchungen fehlen.

Die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone T3 und T4 unterliegen wiederum der Kontrolle von TSH aus dem Hypophysenvorderlappen. Dieses kann ebenfalls über die Bindung von DA an die DRD2-Rezeptoren unterdrückt werden, wodurch DA indirekt die Sekretion der beiden Schilddrüsenhormone hemmt (Deetjen und Speckmann, 1994). Diese inhibierende Eigenschaft wird unter anderem durch die Einnahme von Bromocriptin, einem Arzneistoff aus der Klasse der DRD2-DA-Agonisten, zur Symptomreduzierung einer überfunktionalen Schilddrüse verabreicht (Ohzeki et al., 1993).

Da der TSH-Spiegel allerdings unverändert ist, sind die verringerten Schilddrüsenwerte womöglich auf eine geringe Konzentration von L-Tyrosin zurückzuführen, aus welcher nicht nur die Schilddrüsenhormone sondern auch der Neurotransmitter DA synthetisiert werden (Deme et al., 1978, Lehnert und Wurtman, 1993). Eine Reduktion von L-Tyrosin hätte folglich nicht nur ein DA-Defizit sondern auch einen Mangel der Schilddrüsenhormone zur Folge.

Sowohl eine Schilddrüsenunterfunktion als auch hohe Cortisolwerte sind häufig mit einer Infertilität assoziiert (Bals-Pratsch, 1997; Lado-Abeal 1998; Yoshioka et al., 2014), sodass diese Parameter in Kombination mit einem möglichen Prolaktinüberschuss die geringe Trächtigkeit der homozygoten Weibchen aufgrund des abnormen DA-Systems erklären könnten.

Im Gegensatz zu den weiblichen Tieren fielen die männlichen homozygoten Ratten, im direkten Vergleich zu ihren Wildtypen, mit Versuchsbeginn durch eine ausgeprägte Inaktivität, eine erniedrigte Futtereinnahme und ein vermindertes Körpergewicht auf.

Als zentraler Neurotransmitter zur Bewegungsgenerierung könnte der DA-Mangel innerhalb des mesostriatalen Systems zu einer gestörten DAergen Innervation des Striatums und der beschriebenen abnormen GABAergen Neurotransmission innerhalb des frontostriatalen Regelkreises führen, was infolge dessen die Hypoaktivität bedingen könnte (Sanes und Donoghue, 1993; Baker, 2007). Diese Annahmen stützend, zeigen ähnliche Mausmodelle mit Überexpression des DAT (Donovan et al., 1999; Chen et al., 2008) basal eine verminderte Lokomotion, welche von den Autoren hauptsächlich auf eine Dysfunktion innerhalb des Striatums zurückgeführt wird.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die mögliche Anreicherung von freien Radikalen aufgrund eines erhöhten DA-Umsatzes. Beim Abbau von DA entstehen neben Wasserstoffperoxiden und Quinonen auch Sauerstoffradikale, welche im Zytoplasma neurotoxisch wirken können (Graham, 1978; Stokes et al., 1999). Chen und Mitarbeiter (2008) interpretieren in ihrem DAT-überexprimierenden Mausmodell mit erhöhtem DA-Metabolismus das vermehrt angereicherte zytoplasmatische DA als Grundlage der striatalen Neurodegeneration. Dieser sogenannte oxidative Stress scheint gerade in älteren Tieren eine reduzierte DA-Funktion mit einer verminderten Motorik nach sich zu ziehen (Hall et al, 2014), sodass möglicherweise dadurch die homozygoten Tiere erst im Alter von 3 Monaten phänotypisch auffällig wurden. Neben den motorischen Defiziten bei DA-Mangelerkrankungen wird häufig ein antrieblooses oder depressives Verhalten beobachtet (Besiroglu et al., 2007; Chen und Marsh, 2013; Brady, 2014;), welches wiederum eng mit einer veränderten Nahrungsaufnahme verbunden ist (De Wit et al., 2010). DA ist über das mesolimbische System in emotionale Verarbeitungsprozesse sowie das Belohnungssystem eingebunden und wirkt dabei positiv stimulierend (Fochtmann und Fink, 1992; Wise, 2002). Der Mangel an DA könnte sich daher negativ auf die Futterkonsumption und in deren Folge auch auf das Gewicht dieser Tiere auswirken, da das Essverhalten sowohl über emotionale Vorgänge als auch belohnende Parameter direkt beeinflusst wird (Macht, 2008).

Einerseits könnte die verminderte Nahrungsaufnahme wie in der Studie nach Chen und Mitarbeitern (2008) auf eine dysfunktionale Motorik innerhalb des mesostriatalen Systems zurückgeführt werden. Andererseits wird in dem DAT-KO-Mausmodell nach Costa und Mitarbeitern (2007) eine verstärkte Sukrosekonsumption als Form der Belohnungssteigerung aufgrund eines erhöhten DA-Levels beobachtet. Im Umkehrschluss könnte der DA-Mangel innerhalb des mesolimbischen Systems ein anhedones Verhalten in Form der verringerten Nahrungsaufnahme bewirken. Ein weiterer Hinweis dafür ergibt sich aus dem beschriebenen Serotonin-Defizit und dessen Wirksamkeit bei anhedonen Verhaltensweisen (Krishnan und Nestler, 2008), zumal ein Symptom der Depression die Gewichtsreduktion sein kann (Sunwoo et al., 2011; Davila et al., 2014).

### **5.2.2 Ein potentieller Phänotyp perserverativen Verhaltens der transgenen Tiere**

Die Beurteilung eines basalen Zwangsverhaltens erfolgte für die transgenen Tiere nach denselben Kriterien wie im validen QNP-Modell von Szechtman und Mitarbeiter (1998),



allerdings ohne den Tieren QNP zu applizieren. Ein zwanghaftes Kontrollverhalten wird bei diesem Verhaltensversuch auf einem modifizierten offenen Feld mit 25 Subarealen dadurch angezeigt, dass die Tiere zu ihrem präferierten Areal besonders häufig und besonders schnell zurückkehren und die anderen Areale insgesamt bedeutend seltener besuchen, ehe sie zu ihrer home base zurückkehren.

Im Gegensatz zu den genannten Kriterien für ein zwanghaftes Kontrollverhalten, saßen die Versuchstiere während der gesamten Verhaltensbeobachtung zum überwiegenden Teil an bzw. in unmittelbarer Nähe zu einem bestimmten Areal ohne Exploration des modifizierten offenen Feldes. Die Beschränkung auf dieses eine Areal könnte einerseits durch die bereits beschriebene Hypolokomotion der Tiere bedingt sein, andererseits könnte es auf ein reduziertes Alternationsverhalten in Form einer perserverativen Verhaltensausprägung und somit tierexperimentell auf eine Form des Zwangsverhaltens hindeuten (Ridley, 1994). Dieses zeichnet sich phänomenologisch im Tiermodell der Zwangserkrankung (Yadin et al., 1991; Einat und Szechtman, 1995) als auch bei Zwangspatienten (Demeter et al., 2008; Kim et al., 2009) unter anderem durch ein „Haftenbleiben“ an einen Gedanken/Handlung und durch eine Inflexibilität der exekutiven Funktionen aus. Dieses Verhalten könnte in Anlehnung an die verstärkte Oszillation im beta-Frequenzband der heterozygoten Tiere desselben Stammes erklärt werden, da eine verstärkte Oszillation dieses Frequenzbandes unter anderem mit einer Inflexibilität des Verhaltensoutput und der kognitiven Kontrolle assoziiert wird (Engel und Fries, 2010). Um dieses Verhalten allerdings als ein reduziertes spontanes Alternationsverhalten in Form des perserverativen Verhaltens weiter zu evaluieren, müssten diese Tiere einem spezifischeren Verhaltensparadigma wie beispielsweise dem T-Labyrinth-Test unterzogen werden (Yadin et al., 1991; Einat und Szechtman, 1995).

Interessanterweise verschob sich dieser Phänotyp nach chronischer QNP-Applikation an heterozygoten Tieren desselben Stammes auf ein an die home base gebundenes anhaltendes Putzverhalten (persönliche Mitteilung: AG Winter C.; Wieske F.). Derartig charakteristisch repetitive Handlungen oder Verhaltensweisen werden im Tiermodell der Zwangsstörung unter QNP-Gabe (Eilam und Golani, 1989; Szechtman et al., 1998) als auch äußerst häufig bei Zwangspatienten beobachtet (Leopold und Backenstrass, 2015).

In einer weiteren Untersuchung zeigten die heterozygoten Tiere des vorliegenden Pathologiemodells unter dosisabhängiger Stimulation des nicht-selektiven DA-Agonisten Apomorphin in einem adaptierten Verhaltensparadigma (Costall und Naylor, 1973; Carter und Pycock, 1979) orale Stereotypen, welche womöglich durch die simultane Stimulation beider

Rezeptortypen (Synergismus) bereits bei einem Wert von 2,0 mg/kg den maximalen Verhaltensoutput zur Folge hatten (persönliche Mitteilung: AG Winter C; Callesen H.). Dieser synergistische Effekt mit einem verstärkten Verhaltensoutput wird auch in der Arbeit von Ghisi und Mitarbeitern (2009) näher beschrieben. Hierzu wird in deren DAT-überexprimierenden Mäusen lediglich unter Stimulation beider DA-Rezeptortypen durch Apomorphin oder Koadministration selektiver D1/D2-Agonisten ein verstärktes vertikales Kletterverhalten dokumentiert.

Wie in den vergleichbaren Mausmodellen mit einer Überexpression im DAT beschrieben (Chen et al., 2008; Salahpour et al., 2008; Ghisi et al., 2009), zeigten die transgenen Tiere dieser Arbeit aufgrund der DAT Überexpression ebenfalls eine erhöhte DRD1/DRD2-Dichte, sowie einen möglichen Anstieg in der DA-Ausschüttung. Das perserverative Verhalten der transgenen Tiere könnte daher ein Resultat des akut freigesetzten phasisch angereicherten DA an den sensitiveren postsynaptischen DRD1/DRD2 sein. Die Kombination aus einem überaktiven DAT-System und der zusätzlichen Stimulation des DAergen Systems mittels QNP oder Apomorphin scheint im Gegensatz zu der basalen Überaktivität des DAT andere Symptome der Zwangsstörung zu induzieren (Mataix-Cols et al., 2005), welche wahrscheinlich den unterschiedlichen Gegebenheiten der jeweiligen Neurotransmission zugrunde liegen.

### **5.2.3 Zwanghaftes Kontrollverhalten der chronisch QNP-behandelten Tiere**

Wie bereits bekannt (Szechtman et al., 1998, 2001) führte die 10-malige Gabe des DRD2/DRD3 Agonisten QNP mit jeweiliger konsekutiver Exposition auf dem offenen Feld, zu einem ausgeprägten zwanghaften Kontrollverhalten mit stabilem Phänotyp ab dem 5. Versuchstag bis zum Ende der Verhaltensuntersuchung. Dementsprechend kehrten die chronisch QNP-behandelten Tiere gegenüber ihrer Kontrollgruppe besonders häufig und besonders schnell zu ihrem präferierten Areal zurück und besuchten die anderen Areale insgesamt bedeutend seltener, ehe sie zur ihrer home base zurückkehrten (Einat und Szechtman 1993; Szechtman et al., 2001; Eilam und Szechtman, 2005).

Überdies entwickeln Ratten, wie bereits einleitend erwähnt, unter chronischer QNP-Gabe eine gesteigerte Lokomotion (Szechtman et al., 1994; Szumlinski et al., 1997; Culver et al., 2000). Die Ergebnisse der einzelnen Parameter zur Beurteilung der Zwangssymptomatik könnten daher allein auf die augenscheinlich gesteigerte Lokomotion zurückgeführt werden, da das

hier untersuchte zwanghafte Kontrollverhalten immer auch eine Lokomotion bedingt. Aufgrund der signifikant erhöhten Heimrückkehrrate kann diese Annahme allerdings als unabhängig von Veränderungen der Lokomotion und daher als ein zwanghaftes Kontrollverhalten beurteilt werden (Szechtman et al., 2001, Winter et al., 2008a, Mundt et al., 2009).

Die Induktion des zwanghaften Verhaltens scheint bei den chronischen QNP-Tieren ein reiner QNP- und Kontext-Effekt zu sein, da akut behandelte QNP-Ratten keinerlei zwanghaftes Verhalten zeigten. Diese Tiere wiesen auch keinerlei molekularbiologische Veränderungen auf, sodass die pathophysiologische Ursache des zwanghaften Kontrollverhaltens der chronisch QNP-behandelten Gruppe wahrscheinlich in den striatalen Veränderungen mit verringerten DRD2- VMAT2- und DAT-Werten begründet ist. In tierexperimentellen Untersuchungen in QNP-sensibilisierten Ratten zeigten sich hierzu für das Striatum und den Nucleus accumbens reduzierte DRD2-Werte, ein verminderter DA-Spiegel, eine erhöhte DA-Synthese und regionsabhängig reduzierte bzw. erhöhte DAT-Werte (Chen et al., 1993; Rowlett et al., 1995; Sullivan et al., 1998; Kimmel et al., 2001). Insgesamt wird dabei hauptsächlich eine erhöhte Aktivität des DA-Systems innerhalb der subkortikalen Strukturen mit einer abnormen Modulation des präfrontalen Kortex postuliert. Diese Aussage entspricht der vorherrschenden Modellvorstellung der Zwangsstörung, welche Dysregulationen innerhalb der Basalganglien mit einer Desinhibition auf kortikalem Niveau postuliert (Saxena et al., 1998, 2001; Graybiel et al., 2000; Graybiel und Rauch, 2000; Saxena und Rauch, 2000; Maia et al., 2008).

### 5.3 Gegenüberstellung der beiden Pathologiemodelle und Fazit

Im Gegensatz zu dem typisch zwanghaften Kontrollverhalten des validen Tiermodells der Zwangsstörung zeigten die transgenen Tiere basal ein potentiell perserveratives Verhalten als Form der Zwangsstörung. Die verschiedenen Symptompräsentationen könnten demnach die verschiedenen klinischen Subtypen der Zwangsstörung darstellen, welche nicht nur nach der unterschiedlichen zwanghaften Symptomatik differenziert werden, sondern auch nach dem Ersterkrankungsalter, dem Vorhandensein von Tics oder einer durch Streptokokken-Infektion verursachten Zwangsstörung kategorisiert werden (McKay et al., 2004; Taylor, 2011, 2013). Die zwei Subtypen der vorliegenden Arbeit unterliegen höchstwahrscheinlich der ungleichen Induktionsart, -beginn und -dauer und resultierten hauptsächlich in spezifischen

Veränderungen der verschiedenen striatalen DA-Einheiten. Dementsprechend führte die genetische Manipulation zu einer verstärkten striatalen Genexpression des DAT, des VMAT2 sowie des DRD1 und DRD2. Im Gegensatz dazu induzierte die chronische QNP-Gabe in den striatalen Arealen eine verringerte Genexpressionsrate des DAT, VMAT2 und des DRD2. Die gegenläufigen Ergebnisse könnten als Neuroadaption des DA-System auf einen reduzierten tonischen DA-Spiegel infolge der jeweiligen Manipulation betrachtet werden. Auf der einen Seite induzierte im transgenen Pathologiemodell die DAT-Überexpression einen DA-Mangel, welchen das DA-System über die Hochregulation und mögliche Sensitivierung der beiden Dopaminrezeptoren auszugleichen versucht. Die Genexpressionssteigerung des VMAT2 sowie der erhöhte wahrscheinlich intrasynaptische DA-Umsatz könnten wiederum eine Folge des verstärkten DA-Rücktransport aufgrund der DAT-Überexpression darstellen, wobei hierunter eine erhöhte perisynaptische DA-Konzentration vermutet werden kann. Auf der anderen Seite könnte im pharmakologischen Modell die persistente Stimulation der D2-Rezeptoren zunächst deren Herunterregulation und mögliche Desensitivierung bedingen, worüber die weitere DA-Synthese und -Ausschüttung verhindert werden könnte. Die Folge davon wäre ein mögliches DA-Defizit, welchen das DA-System sowohl über eine reduzierte DAT-Expression als auch einen verringerten DA-Umsatz auszugleichen versucht. Die verstärkte Genexpression des VMAT2 könnte wiederum das Resultat des reduzierten Rücktransports an extrazellulären DA darstellen.

In klinischer Hinsicht ist gerade der signifikant reduzierte DA-Spiegel der transgenen Tiere, als auch ferner der verringerte DA-Umsatz und somit indirekter Nachweis eines ebenfalls verminderten DA-Levels der chronisch QNP-behandelten Tiere, in Einklang mit den Befunden zu Zwangspatienten (Hollander et al., 1992; Zahn et al., 1996), wobei der potentiell erhöhter perisynaptischer DA-Spiegel beider Pathologiemodelle beispielsweise in einer Studie von Wong und Mitarbeitern (2008) dokumentiert wird. Des Weiteren könnten die unterschiedlichen molekularbiologischen Veränderungen der verschiedenen Subtypen die Diskrepanz der klinischen Befunde zur Zwangsstörung erklären. Unter diesen wird einerseits eine erhöhte DAT-Rate (van der Wee et al., 2001, Kim et al., 2003) und andererseits eine verringerte DAT-Genexpression beschrieben (Hesse et al., 2005). Wong und Mitarbeiter (2008) dokumentieren ferner einen Anstieg des DRD2, während in weiteren Studien eine Reduktion beschrieben ist (Denys et al., 2004b, 2013, Perani et al., 2008).

Die Tatsache, dass eine Vielzahl von neurobiologischen Veränderungen mit zwanghaften Verhaltensweisen einhergeht (Schwartz et. al, 1996; Stein, 2002; Maia et al., 2008;

Rasmussen et al., 2013; Bokor et al., 2014) scheint daher nicht weiter verwunderlich, zumal dies auch die verschiedenen klinischen Subtypen und deren unterschiedliches medikamentöses Ansprechen erklären würde (McKay et al., 2004).

Zusammenfassend verdeutlichen die vorliegenden Ergebnisse die pathophysiologische Relevanz eines dysregulativen DA-Systems in der Induktion zwanghafter und somit auch repetitiver Störungen. Zudem liefern die Erkenntnisse über die unterschiedlichen Subtypen der Zwangsstörung einen wichtigen Beitrag um in zukünftigen Untersuchungen die Entwicklung Subtypen-spezifischer Behandlungsmethoden vorzubereiten, wobei eine gemeinsame pathophysiologische Endstrecke in einer Dysregulation der striatalen Regionen vermutet werden kann

## 5.4 Ausblick

Das neu vorgestellte transgene Pathologiemodell bietet viele erfolgversprechende Ansatzpunkte um als neues valides Tiermodell der repetitiven Störungen etabliert zu werden. Als solches würde es in weiterführenden Experimenten zu repetitiven Störungsbildern die Gelegenheit eröffnen *in vivo* die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen dieser krankheitsübergreifenden Symptome besser zu verstehen und somit ggf. gezieltere und erfolgversprechendere Therapiestrategien der einzelnen Erkrankungen repetitiver Störungen fördern.

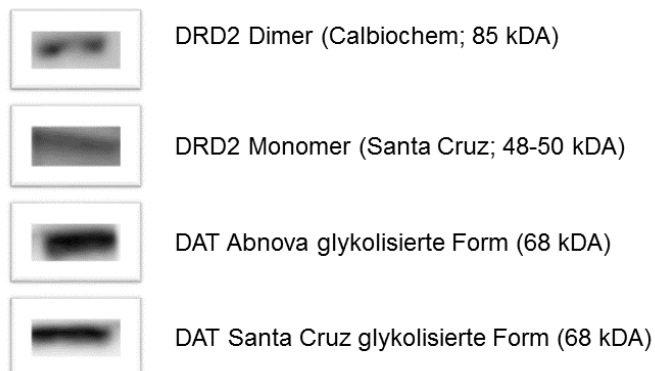
Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse bietet es sich an, zunächst die Konstruktvalidität dieses Pathologiemodells weiter zu evaluieren. In Ergänzung zu den bereits erhobenen elektrophysiologischen Daten könnte diese Verfahrenstechnik in einer umfassenderen Untersuchungsreihe weiterer Kerngebiete des BGTC Regelkreises einerseits einen tiefgreifenden Einblick über die Dysfunktionalität innerhalb dieses Netzwerkes ermöglichen und andererseits auch die Konstruktvalidität weiter unterstützen.

Im Anschluss an die umfassenderen elektrophysiologischen Untersuchungen könnte die Methode der tiefen Hirnstimulation gezielt eingesetzt werden, um die Aktivitätsmuster definierter Kernstrukturen des BGTC Regelkreises selektiv zu beeinflussen, welche gegebenenfalls in einer Symptomreduktion resultieren könnten. Dies würde sowohl Auskunft über die Vorhersagevalidität geben, als auch neue potentiell wirksame Stimulationsareale für die klinische Anwendung liefern.

Ferner ist es wegen des regionsabhängigen Serotonin-Mangels der transgenen Tiere ebenfalls denkbar, dass die Vorbehandlung mit verschiedenen selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer, wie zum Beispiel Clomipramin oder Fluoxetin, vor der jeweiligen QNP-Intervention auf dem modifizierten offenen Feld zu einer Suppression des geschilderten zwanghaften Putzverhaltens führen könnten, wodurch eine gewisse Vorhersagevalidität gegeben wäre.

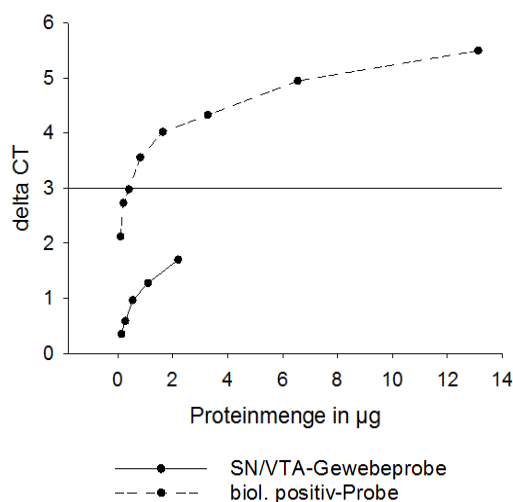
Neben der Etablierung als neues valides Tiermodell der repetitiven Störungen ermöglicht dieses Pathologiemodell die Pathogenese von DA-Mangelerkrankungen genauer zu untersuchen, indem die strukturellen und funktionellen Veränderungen und deren Symptome zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert werden können. Unter demselben Aspekt bietet es ebenfalls als *in vivo* Ansatz die Möglichkeit, verschiedene Dopamin-Wiederaufnahme-Hemmer bzw. selektive Noradrenalin- und Dopamin-Wiederaufnahme-Hemmer auf deren Wirkung und Wirksamkeit zu prüfen.

## Anhang



**Abb. S1: Repräsentative Immunoblots biotinylierter Antikörper.**

Dargestellt sind 10 %ige SDS-Gele nach elektrophoretischer Auftrennung der Protein-Produkte einer biologischen positiv-Probe, die unter Verwendung der selektierten biotinylierten Antikörper mittels Western-Blot erzeugt wurden. DAT = Dopamintransporter, DRD2 = D2-Dopaminrezeptor, kDA = Kilodalton



**Abb. S2: Repräsentative Darstellung der TaqMan®-Protein Expression Assay-Methode.**

Abgebildet ist das Ergebnis für die Gewebeprobe Substantia nigra/ventrales tegmentales Arela (SN/VTA) sowie für die Gewebeprobe eines ¼ naiven Rattengehirns (biol. positiv Probe), welche unter Verwendung des spezifischen Dopamintransporter-Antikörper (H0000653-D01P/Abnova) erzeugt wurden. Delta C<sub>T</sub> = Threshold Cycle.

**Tab. S1: Liste der verschiedenen Etablierungsschritte der TaqMan® Protein Expression Assay-Methode.**

1/2 Strituum = Striatum einer Gehirnhälfte; 10x/20x = 10-fache/20-fache Menge an Biotin;  $\Delta C_T$  = Delta Threshold Cycle; ABI = Applied Biosystems; AK = Antikörper; alle 9 Areale = alle einzelnen Areale des Basalganglien-thalamo-kortikalen Regelkreises dieser Studie zusammen; Assays A bzw. B = biotinylierte Antikörper + 3'- bzw. 5'-Oligonukleotidlösung; CPu = Stanze des Nukleus caudatus/Putamen; DAT = Dopamintransporter; DRD2 = Dopaminrezeptor 2; FPT = Forced Proximity-Test; G1T8/G5T1 = eigene Tiernummern-Bezeichnung; M&N = Macherey und Nagel; NAc = Stanze des Nucleus accumbens; NK = Negativkontrolle; Quant-Kit = Kit der Firma Applied Biosystems; SN/VTA = Stanze der Substantia nigra/ventrales tegmentales Areal; T-PER = Gewebe-Protein Extraktions-Reagent .

Antikörper	Biotin	FPT	Probe/Konzentration	Kit	Assays	NK	Ergebnis
DAT (ab5990) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.16$	rekombinantes Protein (10.000pg to 0.6pg)	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
DAT (ab5981) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.09$	(H00006531-P01) abcam	M&N	6µl A+6µl B		kein Ergebnis
DAT (ab5990) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.16$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	4.8µl A+4.8µl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
DAT (ab5981) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.09$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 1.5$
DAT (ab5990) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.16$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	3.6µl A+3.6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 1.85$
DAT (ab5981) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.09$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	1%gelatine+0.05% tween	$\Delta C_T = 1.99$
DAT (ab5990) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.16$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	3.6µl A+3.6µl B	1%gelatine+0.05% tween	$\Delta C_T = 1.88$
DAT (ab5981) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.09$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	1% milk	kein Ergebnis
DAT (ab5990) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.16$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	3% milk	kein Ergebnis
DAT (ab5981) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.09$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	5% milk	kein Ergebnis
DAT (ab5990) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.16$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	0.5% gelatine+0.05% Tween	kein Ergebnis
DAT (ab5981) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.09$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	1% gelatine+0.05% Tween	$\Delta C_T = 2.19$
DAT (ab5990) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.16$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	0.5% gelatine+0.1% Tween	kein Ergebnis
DAT (ab5981) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.09$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	1% gelatine+0.1% Tween	kein Ergebnis
DAT (ab5990) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.16$	Tier G1T8 (CPu)	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 1.06$
DAT (ab5981) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 11.09$	Tier G1T8 (CPu)	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 1.06$
D2DR (324393) poly/ Calbiochem	20x	$\Delta C_T = 11.55$	1/2 Striatum=19.83mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	4% goat	$\Delta C_T = 0.86$
D2DR (324393) poly/ Calbiochem	20x	$\Delta C_T = 11.55$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 0.86$
D2DR (324393) poly/ Calbiochem	20x	$\Delta C_T = 11.55$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 0.68$ ,
D2DR (324393) poly/ Calbiochem	20x	$\Delta C_T = 11.55$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	4.8µl A+4.8µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 0.47$
D2DR (324393) poly/ Calbiochem	20x	$\Delta C_T = 11.55$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	3.6µl A+3.6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 0.32$
D2DR (324393) poly/ Calbiochem	20x	$\Delta C_T = 11.55$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	2.4µl A +2.4µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 0.42$
D2DR (324393) poly/ Calbiochem	20x	$\Delta C_T = 11.55$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	M&N	1.2µl A+1.2µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 0.04$
DAT (sc-14002-L) poly/Santa Cruz	20x	$\Delta C_T = 11.44$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	T-Per	6µl A+6µl B/4.8µl A+4.8µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 0.32$
DAT (H0000653-D01P) poly/Abnova	20x	$\Delta C_T = 10.78$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	T-Per	6µl A+6µl B/4.8µl A+4.8µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 0.66$
D2DR (sc-7552-L) poly/ Santa Cruz	20x	$\Delta C_T = 10.31$	1/2 Striatum=18.77mg/ml	T-Per	6µl A+6µl B/4.8µl A+4.8µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 0.5$
DAT abcam+ Dat Abnova	20x	$\Delta C_T = 11.44$	Gehirnprobe= 2.7 mg/ml	T-Per	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
Dat santa+ Dat Abnova	20x	$\Delta C_T = 10.78$	Gehirnprobe= 2.7 mg/ml	T-Per	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 0.57$
D2 Santa+ D2 Calb	20x	$\Delta C_T = 10.31$	Gehirnprobe= 2.7 mg/ml	T-Per	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 0.48$
DAT (sc-14002-L) poly/Santa Cruz	10x	$\Delta C_T = 9.50$	Gehirnprobe = 2.91mg/ml	T-Per	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
D2DR (sc-7552-L) poly/ Santa Cruz	10x	$\Delta C_T = 11.95$	Gehirnprobe = 2.91mg/ml	T-Per	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
D2DR (324393) poly/ Calbiochem	10x	$\Delta C_T = 10.98$	Gehirnprobe = 2.91mg/ml	T-Per	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
DAT mono+DAT Abcam	20x	$\Delta C_T = 9.50$	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 2.4$
DAT mono+DAT santa	20x	$\Delta C_T = 11.95$	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 2.2$
DAT abnova+Dat Santa	20x	$\Delta C_T = 10.98$	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 2.6$
DAT mono+DAT Ab 20x	20x	$\Delta C_T = 9.50$	rekombinantes Protein	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
DAT mono+DAT santa 20x	20x	$\Delta C_T = 11.95$	rekombinantes Protein	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
DAT abnova+Dat Santa 20x	20x	$\Delta C_T = 10.98$	rekombinantes Protein	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
DAT (ab5990) poly/abcam	20x	$\Delta C_T = 9.50$	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6µl A+6µl B	Lysate dilution buffer	$\Delta C_T = 1.5$



→Fortsetzung der Liste der verschiedenen Etablierungsschritte der TaqMan® Protein Expression Assay-Methode.

Antikörper	Biotin	FPT	Probe/Konzentration	Kit	Assays	NK	Ergebnis
DAT (H0000653-D01P) poly/Abnova	20x	ΔCT=11.95	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=2.22
DAT (sc-14002-L) poly/Santa Cruz	10x	ΔCT=10.98	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT= 2.04
D2 Santa+ D2 Calb 20x	20x	ΔCT=9.50	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=1.0
D2DR (324393) poly/ Calbiochem	20x	ΔCT=11.95	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=1.75
D2DR (sc-7552-L) poly/ Santa Cruz	20x	ΔCT=10.98	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT= 2.9
D2DR (324393) poly/ Calbiochem	10x	ΔCT=9.50	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=1.9
D2DR (sc-7552-L) poly/ Santa Cruz	10x	ΔCT=11.95	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=0.25
D2DR (sc-7552-L) poly/ Santa Cruz	20x	ΔCT=10.98	Tier G5 T 1 SN/VTA	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=0.52
DAT (sc-14002-L) poly/Santa Cruz	10x	ΔCT=9.50	Tier G5 T 1 SN/VTA	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=0.98
<b>DAT (H0000653-D01P) poly/Abnova</b>	<b>20x</b>	<b>ΔCT=11.95</b>	<b>Tier G5 T 1 SN/VTA</b>	<b>M&amp;N</b>	<b>6μl A+6μl B</b>	<b>Lysate dilution buffer</b>	<b>ΔCT=0.32 -1.89</b>
DAT (sc-14002-L) poly/Santa Cruz	10x	ΔCT=10.98	Tier G5 T 1 SN/VTA	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=0.66
D2DR (sc-7552-L) poly/ Santa Cruz	20x	ΔCT=9.50	Tier G5 T 1 SN/VTA	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=0.03
DAT (H0000653-D01P) poly/Abnova	20x	ΔCT=11.95	G5 T 1 NAc+CPu	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
DAT (sc-14002-L) poly/Santa Cruz	10x	ΔCT=10.98	G5 T 1 NAc+CPu	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
D2DR (sc-7552-L) poly/ Santa Cruz	20x	ΔCT=9,50	G5 T 1 NAc+CPu	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	kein Ergebnis
DAT (sc-14002-L) poly/Santa Cruz	20x	ΔCT=10.98	Gehirnprobe Tier G5 T1	M&N	16μl Probe 2μl Assay	Lysate dilution buffer	ΔCT=0.14
DAT (sc-14002-L) poly/Santa Cruz	20x	ΔCT=9.9	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=2.8
D2DR (sc-7552-L) poly/ Santa Cruz	20x	ΔCT=9.2	alle 9 Areale=0.82mg/ml	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=3.0
<b>DAT (H0000653-D01P) poly/Abnova</b>	<b>20x</b>	<b>ΔCT=7.9</b>	<b>alle 9 Areale=0.82mg/ml</b>	<b>M&amp;N</b>	<b>6μl A+6μl B</b>	<b>Lysate dilution buffer</b>	<b>ΔCT=2.7-5.63</b>
DAT (H0000653-D01P) poly/Abnova	20x	ΔCT=7.9	NAc+CPu transgenes Tier	M&N	6μl A+6μl B	Lysate dilution buffer	ΔCT=0.44

## Literaturverzeichnis

1. Ackermans L, Kuhn J, Neuner I, Temel Y, Visser-Vandewalle V. (2013) Surgery for Tourette syndrome. *World Neurosurg.* 80(3-4):S29.e15-22.
2. Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. (2005) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* München, Jena, Urban & Fischer Verlag.
3. Albelda N, Joel D. (2012) Animal models of obsessive-compulsive disorder: exploring pharmacology and neural substrates. *Neurosci Biobehav Rev.* 36(1):47-63.
4. Alexander G. E. und Crutcher M. D. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: Neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13(7), 266-71.
5. American Psychiatric Association. (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5 Ausgabe. Washington, DC: American Psychiatric Association.
6. Baker SN. (2007) Oscillatory interactions between sensorimotor cortex and the periphery. *Curr Opin Neurobiol.* 17(6):649-55.
7. Bals-Pratsch M. (1997) Episodic variations of prolactin, thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone, melatonin and cortisol in infertile women with subclinical hypothyroidism. *Human Reproduction.* 12(5):896-904.
8. Beaulieu JM., Sotnikova TD., Yao WD., Kockeritz L., Woodgett JR., Gainetdinov RR., Caron MG. (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(14):5099-104.
9. Beaulieu JM, Tirotta E, Sotnikova TD, Masri B, Salahpour A, Gainetdinov RR, Borrelli E, Caron MG. (2007) Regulation of Akt signaling by D2 and D3 dopamine receptors in vivo. *J Neurosci.* 27(4):881-5.
10. Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. (2015) Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol.* 172(1):1-23.
11. Bergman H, Feingold A, Nini A, Raz A, Slovin H, Abeles M, Vaadia E. (1998) Physiological aspects of information processing in the basal ganglia of normal and parkinsonian primates. *Trends Neurosci.* 21(1):32-8.
12. Besiroglu L, Uguz F, Saglam M, Agargun MY, Cilli AS. (2007) Factors associated with major depressive disorder occurring after the onset of obsessive-compulsive disorder. *J Affect Disord.* 102(1-3):73-9.
13. Binder DK., Iskandar BJ. (2000) Modern neurosurgery for psychiatric disorders. *Neurosurgery.* 47(1):9-21
14. Björklund A., Dunnett SB. (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30(5):194-202.

15. Bokor G., Anderson PD. (2014) Obsessive-compulsive disorder. *J Pharm Pract.* 27(2):116-130.
16. Borcharding BG., Keysor CS., Rapoport JL., Elia J., Amass J. (1990) Motor/vocal tics and compulsive behaviors on stimulant drugs: is there a common vulnerability? *Psychiatry Res.* 33(1):83-94.
17. Brady CF. (2014) Obsessive-compulsive disorder and common comorbidities. *J Clin Psychiatry.* 75(1):e02.
18. Brennan BP., Rauch SL., Jensen JE., Pope HG. Jr. (2013) A critical review of magnetic resonance spectroscopy studies of obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry.* 73(1):24-31.
19. Bronfeld M, Bar-Gad I. (2013) Tic disorders: what happens in the basal ganglia? *Neuroscientist.* 19(1):101-8.
20. Brown JM., Hanson GR., Fleckenstein AE. (2001) Cocaine-induced increases in vesicular dopamine uptake: role of dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 298(3):1150-3.
21. Brüss M., Wieland A, Bönisch H. (1999) Molecular cloning and functional expression of the mouse dopamine transporter. *J Neural Transm.* 106(7-8):657-62.
22. Butler IJ., Koslow SH., Seifert WE. Jr. (1979) Caprioli RM, Singer HS. Biogenic amine metabolism in Tourette syndrome. *Ann Neurol* 6(1):37-9.
23. Calderoni S., Bellani M., Hardan AY., Muratori F., Brambilla P. (2014) Basal ganglia and restricted and repetitive behaviours in Autism Spectrum Disorders: current status and future perspectives. *Epidemiol Psychiatr Sci.* 23(3):235-8.
24. Canales JJ, Graybiel AM. (2000) A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nat Neurosci.* 3(4):377-83.
25. Carter CJ, Pycock CJ. (1979) The effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesions of extrapyramidal and mesolimbic sites on spontaneous motor behaviour, and amphetamine-induced stereotypy. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 308(1):51-4.
26. Chabardès S, Polosan M, Krack P, Bastin J, Krainik A, David O, Bougerol T, Benabid AL. (2013) Deep brain stimulation for obsessive-compulsive disorder: subthalamic nucleus target. *World Neurosurg.* 80(3-4):S31.e1-8.
27. Chamberlain S.R., Blackwell A.D., Fineberg N.A., Robbins T.W., Sahakian B.J. (2005) The neuropsychology of obsessive compulsive disorder: The importance of failures in cognitive and behavioural inhibition as candidate endophenotypic markers. *Neuroscience and Biobehavioral Review.* 29(3):399-419.
28. Chen JF, Aloyo VJ., Weiss B. (1993) Continuous treatment with the D2 dopamine receptor agonist quinpirole decreases D2 dopamine receptors, D2 dopamine receptor messenger RNA and proenkephalin messenger RNA, and increases mu opioid receptors in mouse striatum. *Neuroscience.* 54(3):669-80.

- 
29. Chen L, Ding Y, Cagniard B, Van Laar AD, Mortimer A, Chi W, Hastings TG, Kang UJ, Zhuang X. (2008) Unregulated cytosolic dopamine causes neurodegeneration associated with oxidative stress in mice. *J Neurosci.* 28(2):425-33
30. Chen JJ., Marsh L. (2013) Depression in Parkinson's disease: identification and management. *Pharmacotherapy.* 33(9):972-83.
31. Cheon KA, Ryu YH, Namkoong K, Kim CH, Kim JJ, Lee JD. (2004) Dopamine transporter density of the basal ganglia assessed with [123I]IPT SPECT in drug-naive children with Tourette's disorder. *Psychiatry Res.* 130(1):85-95.
32. Chiba M. (2014) Differential expression of natural antisense transcripts during liver development in embryonic mice, *Biomed Rep.* 2(6):918-922.
33. Cohen DJ., Shaywitz BA., Caparulo B., Young JG., Bowers MB. Jr. (1978) Chronic, multiple tics of Gilles de la Tourette's disease. CSF acid monoamine metabolites after probenecid administration. *Arch Gen Psychiatry.* 35(2):245-50.
34. Coltart I., Bronisch T., Hiller W., Mombour W., Zaudig M., Freyberger M., Kessler C. (2001) Internationale Klassifikation neurologischer Erkrankungen, 10 Revision. der WHO. Bern: Hans-Huber.
35. Costa RM., Gutierrez R., de Araujo IE., Coelho MR., Kloth AD., Gainetdinov RR., Caron MG., Nicolelis MA., Simon SA. (2007) Dopamine levels modulate the updating of tastant values. *Genes Brain Behav.* 6(4):314-20.
36. Costall B, Naylor RJ. (1973) On the mode of action of apomorphine. *Eur J Pharmacol.* 21(3):350-61.
37. Covey DP., Juliano SA., Garris PA. (2013) Amphetamine elicits opposing actions on readily releasable and reserve pools for dopamine. *PLoS One.* 8(5) 60763.
38. Cummings JL. (1993) The neuroanatomy of depression. *J Clin Psychiatry.* 54 Suppl:14-20.
39. Dahlström A., Fuxe K. (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl.* SUPPL 232:1-55.
40. Daws LC., Callaghan PD., Morón JA., Kahlig KM., Shippenberg TS., Javitch JA., Galli A. (2002) Cocaine increases dopamine uptake and cell surface expression of dopamine transporters. *Biochem Biophys Res Commun.* 290(5):1545-50.
41. Davila EP., Kolodziejczyk JK., Norman GJ., Calfas K., Huang JS., Rock CL., Griswold W., Fowler JH., Marshall SJ., Gupta A., Patrick K. (2014) Relationships between depression, gender, and unhealthy weight loss practices among overweight or obese college students. *Eat Behav.* 15(2):271-4.
42. Deetjen P., Speckmann E.J. (1994) *Physiologie*, 2 Auflage. München: Urban und Schwarzenberg.

- 
43. Dehorter N., Guigoni C., Lopez C., Hirsch J., Eusebio A., Ben-Ari Y., Hammond C. (2009) Dopamine-deprived striatal GABAergic interneurons burst and generate repetitive gigantic IPSCs in medium spiny neurons. *J Neurosci.* 29(24):7776-87.
44. Del Casale A, Kotzalidis GD, Rapinesi C, Serata D, Ambrosi E, Simonetti A, Pompili M, Ferracuti S, Tatarelli R, Girardi P. (2011) Functional neuroimaging in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology.* 2011;64(2):61-85.
45. Deme D, Gavaret JM, Pommier J, Nunez J. (1978) In vitro synthesis of 3,5,3'-triiodothyronine catalyzed by thyroid peroxidase *Ann Endocrinol (Paris).* 39(1):69-70.
46. Demeter G., Csigó K., Harsányi A., Németh A., Racsmány M. (2008) Impaired executive functions in obsessive compulsive (OCD). *Psychiatr Hung.* 23(2):85-93.
47. Denys D., de Vries F., Cath D., Figee M., Vulink N., Veltman DJ., van der Doef TF., Boellaard R., Westenberg H., van Balkom A., Lammertsma AA., van Berckel BN. (2013) Dopaminergic activity in Tourette syndrome and obsessive-compulsive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol.* 23(11):1423-31.
48. Denys D., van der Wee N., Janssen J., De Geus F., Westenberg HG. (2004b). Low level of dopaminergic D2 receptor binding in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 55(10):1041-5.
49. Denys D., Zohar J., Westenberg H.G. (2004a) The role of dopamine in obsessive-compulsive disorder: preclinical and clinical evidence. *Journal of Clinical Psychiatry* 65 (Suppl. 14). 11–17.
50. De Wit L., Luppino F., van Straten A., Penninx B., Zitman F., Cuijpers P. (2010) Depression and obesity: a meta-analysis of community-based studies. *Psychiatry Res.* 178(2):230-5.
51. Di Giovanni G., Di Matteo V., Pierucci M., Esposito E. (2008) Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res.* 172:45-71.
52. Diwadkar VA., Bakshi N., Gupta G., Pruitt P., White R., Eickhoff SB. (2014) Dysfunction and Dysconnection in Cortical-Striatal Networks during Sustained Attention: Genetic Risk for Schizophrenia or Bipolar Disorder and its Impact on Brain Network Function. *Front Psychiatry.* 5:50.
53. Donovan DM., Miner LL., Perry MP., Revay RS., Sharpe LG., Przedborski S., Kostic V., Philpot RM., Kirstein CL., Rothman RB., Schindler CW., Uhl GR. (1999) Cocaine reward and MPTP toxicity: alteration by regional variant dopamine transporter overexpression. *Brain Res Mol Brain Res.* 73(1-2):37-49.
54. Eilam D, Golani I. (1989) Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment. *Behav Brain Res.* 34(3):199-211.
55. Eilam D., Szechtman H. (2005) Psychostimulant-induced behavior as an animal model of obsessive-compulsive disorder: an ethological approach to the form of compulsive rituals. *CNS Spectr.* 10(3):191-202.

56. Einat H., Szechtman H. (1995) Perseveration without hyperlocomotion in a spontaneous alternation task in rats sensitized to the dopamine agonist quinpirole, *Physiol Behav.* 57(1):55-9.
57. Einat H, Szechtman H. (1993) Environmental modulation of both locomotor response and locomotor sensitization to the dopamine agonist quinpirole. *Behav Pharmacol.* (4):399-403.
58. Eisen JL., Pinto A., Mancebo MC., Dyck IR., Orlando ME., Rasmussen SA. (2010) A 2-year prospective follow-up study of the course of obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychiatry.* 71(8):1033-9.
59. Eisenhofer G., Kopin IJ., Goldstein DS. (2004) Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev.* 56(3):331-49.
60. Engel AK, Fries P. (2010) Beta-band oscillations--signalling the status quo? *Curr Opin Neurobiol.* 20(2):156-65.
61. Ernst M, Zametkin AJ, Jons PH, Matochik JA, Pascualvaca D, Cohen RM. (1999) High presynaptic dopaminergic activity in children with Tourette's disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 38(1):86-94.
62. Fauchey V., Jaber M., Caron MG., Bloch B., Le Moine C. (2000) Differential regulation of the dopamine D1, D2 and D3 receptor gene expression and changes in the phenotype of the striatal neurons in mice lacking the dopamine transporter. *Eur J Neurosci.* 12(1):19-26.
63. Felice LJ., Felice JD., Kissinger PT. (1978) Determination of catecholamines in rat brain parts by reverse-phase ion-pair liquid chromatography. *Journal of Neurochemistry.* 31(6):1461-5
64. Filipowicz W., Bhattacharyya SN., Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9(2):102-14.
65. Fitzgerald P., Dinan TG. (2008) Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J Psychopharmacol.* 22(2 Suppl):12-9.
66. Fochtmann L., Fink M. (1992) Role of dopamine in mood disorders. *Compr Psychiatry.* 33(6):417-8.
67. Freeman ME., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80(4):1523-631.
68. Friedlander L., Desrocher M. (2006) Neuroimaging studies of obsessive compulsive disorder in adults and children. *Clin Psychol Rev.* 26(1):32-49.
69. Ghisi V., Ramsey AJ., Masri B., Gainetdinov RR., Caron MG., Salahpour A. (2009) Reduced D2-mediated signaling activity and trans-synaptic upregulation of D1 and D2 dopamine receptors in mice overexpressing the dopamine transporter. *Cell Signal.* 21(1):87-94.

70. Ginovart N., Farde L., Halldin C., Swahn CG. (1999) Changes in striatal D2-receptor density following chronic treatment with amphetamine as assessed with PET in nonhuman primates. *Synapse*. 31(2):154-62.
71. Giros B, Caron MG. (1993) Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci*.14(2):43-9.
72. Giros B., Jaber M., Jones SR., Wightman RM., Caron MG. (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*. 379(6566):606-12.
73. Gobert A., Rivet J. M., Audinot V., Cistarelli L., Spedding M., Vian J., et al. (1995). Functional correlates of dopamine D3 receptor activation in the rat in vivo and their modulation by the selective antagonist, (+)-S 14297: II. Both D2 and "silent" D3 autoreceptors control synthesis and release in mesolimbic, mesocortical and nigrostriatal pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 275(2), 899-913.
74. Gomes de Alvarenga P., de Mathis MA., Dominguez Alves AC., do Rosário MC., Fossaluza V., Hounie AG., Miguel EC., Rodrigues Torres A. (2012) Clinical features of tic-related obsessive-compulsive disorder: results from a large multicenter study. *CNS Spectr*. 17(2):87-93.
75. Goodman WK., McDougle CJ., Price LH., Riddle MA., Pauls DL., Leckman JF. (1990) Beyond the serotonin hypothesis: a role for dopamine in some forms of obsessive compulsive disorder? *J Clin Psychiatry*.51 Suppl:36-43; discussion 55-8.
76. Grace AA. (2000) The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction*. 95 Suppl 2. S119-28.
77. Grace AA. (1993) Cortical regulation of subcortical dopamine systems and its possible relevance to schizophrenia. *J Neural Transm Gen Sect*. 91(2-3), 111-34.
78. Grace AA., Floresco SB., Goto Y., Lodge DJ. (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci*. 30(5):220-7.
79. Graham DG. (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol*. 14(4):633-43.
80. Graybiel AM. (2000) The basal ganglia. *Curr Biol*. 10(14), R509-11.
81. Graybiel AM., Rauch SL. (2000) Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Neuron*. 28(2):343-7.
82. Guiard BP., El Mansari M., Merali Z., Blier P. (2008) Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. *Int J Neuropsychopharmacol*. 11(5):625-39.
83. Gulley JM, Zahniser NR. (2003) Rapid regulation of dopamine transporter function by substrates, blockers and presynaptic receptor ligands. *Eur J Pharmacol*. 479(1-3):139-52.

- 
84. Haber SN. (2003) The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chem Neuroanat.* 26(4):317-330.
85. Haber SN., Calzavara R. (2009) The cortico-basal ganglia integrative network: the role of the thalamus. *Brain Res Bull.* 78(2-3):69-74.
86. Hall FS, Itokawa K, Schmitt A, Moessner R, Sora I, Lesch KP, Uhl GR. (2014) Decreased vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) and dopamine transporter (DAT) function in knockout mice affects aging of dopaminergic systems. *Neuropharmacology.* 76 Pt A:146-55
87. Hammond C, Bergman H, Brown P. (2007) Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci.* 30(7):357-64.
88. Harrison BJ, Soriano-Mas C, Pujol J, Ortiz H, López-Solà M, Hernández-Ribas R, Deus J, Alonso P, Yücel M, Pantelis C, Menchon JM, Cardoner N. (2009) Altered corticostriatal functional connectivity in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 66(11):1189-200.
89. Henry DJ, Hu XT, White FJ. (1998) Adaptations in the mesoaccumbens dopamine system resulting from repeated administration of dopamine D1 and D2 receptor-selective agonists: relevance to cocaine sensitization. *Psychopharmacology (Berl).* 140(2):233-42.
90. Hesse S, Müller U, Lincke T, Barthel H, Villmann T, Angermeyer MC, Sabri O, Stengler-Wenzke K. (2005) Serotonin and dopamine transporter imaging in patients with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res.* 140(1):63-72.
91. Hoffman KL., Rueda Morales RI. (2012) D1 and D2 dopamine receptor antagonists decrease behavioral bout duration, without altering the bout's repeated behavioral components, in a naturalistic model of repetitive and compulsive behavior. *Behav Brain Res.* 230(1):1-10.
92. Hollander E, Stein DJ, Saoud JB, DeCaria CM, Cooper TB, Truong S, Stanley M, Liebowitz MR. (1992) Effects of fenfluramine on plasma HVA in OCD. *Psychiatry Res.* 42(2):185-8.
93. Horwath E., Weissman MM. (2000) The epidemiology and cross-national presentation of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am.* 23(3):493-507.
94. Husted DS, Shapira NA. (2004). A review of the treatment for refractory obsessive-compulsive disorder: from medicine to deep brain stimulation. *CNS Spectr* 9: 833–847.
95. Jaakkola E., Kaasinen V., Siri C., Martikainen K., Cilia R., Niemelä S., Joutsa J. (2014) Impulse control disorders are associated with multiple psychiatric symptoms in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 4(3):507-15.
96. Jinek M., Doudna JA. (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference, *Nature.* 457(7228):405-12.
97. Jones SR., Gainetdinov RR., Jaber M., Giros B., Wightman RM., Caron MG. (1998) Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(7):4029-34.



98. Joshua M, Adler A, Bergman H. (2009) The dynamics of dopamine in control of motor behavior. *Curr Opin Neurobiol.* 19(6):615-20.
99. Karch S, Pogarell O. (2011) Neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Nervenarzt.* 82(3):299- 307.
100. Kariuki-Nyuthe C, Gomez-Mancilla B., Stein DJ. (2014) Obsessive compulsive disorder and the glutamatergic system *Curr Opin Psychiatry.* 27(1):32-7.
101. Karstaedt P.J., Kerasidis H., Pincus J.H., Meloni R., Graham J., Gale K. (1994) Unilateral destruction of dopamine pathways increases ipsilateral striatal serotonin turnover in rats. *Exp. Neurol.* 26(1):25-30.
102. Kim CH., Koo MS., Cheon KA., Ryu YH., Lee JD., Lee HS. (2003) Dopamine transporter density of basal ganglia assessed with [<sup>123</sup>I]IPT SPET in obsessive-compulsive disorder. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 30(12):1637-43.
103. Kim MS, Jang KM. (2009) The neuropsychological profile of a subclinical obsessive-compulsive sample. *J Int Neuropsychol Soc.* 15(2):286-90.
104. Kimmel HL, Joyce AR., Carroll FI., Kuhar MJ. (2001) Dopamine D1 and D2 receptors influence dopamine transporter synthesis and degradation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 298(1):129-40.
105. Klavir O., Flash S., Winter C., Joel D. (2009) High frequency stimulation and pharmacological inactivation of the subthalamic nucleus reduces 'compulsive' lever-pressing in rats. *Exp Neurol.* 215(1):101-9.
106. Koeltzow TE, Austin JD, Vezina P. (2003) Behavioral sensitization to quinpirole is not associated with increased nucleus accumbens dopamine overflow. *Neuropharmacology.* 44(1):102-10.
107. Koo MS, Kim EJ., Roh D., Kim CH. (2010) Role of dopamine in the pathophysiology and treatment of obsessive-compulsive disorder. *Expert Rev Neurother.* 10(2):275-90.
108. Korff S., Harvey B. H. (2006) Animal models of obsessive-compulsive disorder: Rationale to understanding psychobiology and pharmacology. *Psychiatr Clin North Am.* 29(2), 371-90.
109. Kouris S. (1998) Methylphenidate-induced obsessive-compulsiveness. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 37(2), 135.
110. Krishnan V., Nestler E.J. (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455(7215):894-902.
111. Lacerda AL., Dalgalarrrondo P., Caetano D., Haas GL., Camargo EE., Keshavan MS. (2003) Neuropsychological performance and regional cerebral blood flow in obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27(4):657-65.

112. Lado-Abeal J., Rodriguez-Arnan J., Newell-Price JD., Perry LA., Grossman AB., Besser GM., Trainer PJ. (1998) Menstrual abnormalities in women with Cushing's disease are correlated with hypercortisolemia rather than raised circulating androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(9):3083-8.
113. Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5.
114. Leaney JL, Benians A, Brown S, Nobles M, Kelly D, Tinker A. (2004) Rapid desensitization of G protein-gated inwardly rectifying K(+) currents is determined by G protein cycle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287(1):C182-91.
115. Leckman J. F., Denys D. D., Simpson H. B., Mataix-Cols D., Hollander E., Saxena S., Miguel EC, Rauch SL, Goodman WK, Phillips KA, Stein DJ. (2010) Obsessive-compulsive disorder: A review of the diagnostic criteria and possible subtypes and dimensional specifiers for DSM-V. *Depress Anxiety.* 27(6):507-27.
116. Lehnert H, Wurtman RJ. (1993) Amino acid control of neurotransmitter synthesis and release: physiological and clinical implications. *Psychother Psychosom.* 60(1):18-32.
117. Leon T., Garcia MJ., Danke I., Toro P. (2014) Resting State in Obsessive-Compulsive Disorder. A review of the literature. *Actas Esp Psiquiatr.* 42(5):250-8.
118. Leopold R, Backenstrass M. (2015) Neuropsychological differences between obsessive-compulsive washers and checkers: A systematic review and meta-analysis. *J Anxiety Disord.* 30C:48-58.
119. Liu H., Dong F., Meng Z., Zhang B., Tan J., Wang Y. (2010) Evaluation of Tourette's syndrome by (99m)Tc-TRODAT-1 SPECT/CT imaging. *Ann Nucl Med.* 24(7):515-21.
120. Lopes AC., de Mathis ME., Canteras MM., Salvajoli JV., Del Porto JA., Miguel EC. (2004) Update on neurosurgical treatment for obsessive compulsive disorder. *Rev Bras Psiquiatr.* 26(1):62-6.
121. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farra AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75.
122. Macht M. (2008) How emotions affect eating: a five-way model. *Appetite.* 50(1):1-11.
123. Maia T. V., Cooney R. E. & Peterson B. S. (2008) The neural bases of obsessive-compulsive disorder in children and adults. *Development and Psychopathology.* 20(4):1251-83.
124. Mallet L., Polosan M., Jaafari N., Baup N., Welter ML., Fontaine D., du Montcel ST., Yelnik J., Chéreau I., Arbus C., Raoul S., Aouizerate B., et al. (2008) Subthalamic nucleus stimulation in severe obsessive-compulsive disorder. *N Engl J Med.* 359(20):2121-34.
125. Marsden C.A. (1991) The neuropharmacology of serotonin in the central nervous system Selective Serotonin Reuptake Inhibitors S.11 Chichester Hrsg.: Feighner, J.P., Boyer, W.F., 1 John Wiley und Sons. 0-471-92890-9 #88

126. Mash DC, Pablo J, Ouyang Q, Hearn WL, Izenwasser S. (2002) Dopamine transport function is elevated in cocaine users. *J Neurochem.* 81(2):292-300.
127. Mataix-Cols D, Rosario-Campos MC, Leckman JF. (2005) A multidimensional model of obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry.* 162(2):228-38.
128. McDougle CJ., Goodman WK., Price LH. (1994) Dopamine antagonists in tic-related and psychotic spectrum obsessive compulsive disorder. *J Clin Psychiatry.* 55 Suppl: 24-31.
129. McKay, D., Abramowitz, J.S., Calamari, J.E., Kyrios, M., Radomsky, A., Sookman, D., Taylor, S., Wilhelm, S. (2004) A critical evaluation of obsessive-compulsive disorder subtypes: symptoms versus mechanisms. *Clin Psychol Rev.* 24(3):283-313
130. Mundt A, Klein J, Joel D, Heinz A, Djodari-Irani A, Harnack D, Kupsch A, Orawa H, Juckel G, Morgenstern R, Winter C. (2009) High-frequency stimulation of the nucleus accumbens core and shell reduces quinpirole-induced compulsive checking in rats. *Eur J Neurosci.* 29(12):2401-12.
131. Müller-Vahl KR., Berding G., Brücke T., Kolbe H., Meyer GJ., Hundeshagen H., Dengler R., Knapp WH., Emrich HM. (2000) Dopamine transporter binding in Gilles de la Tourette syndrome. *J Neurol.* 247(7):514-20.
132. Nader MA., Daunais JB., Moore T, Nader SH., Moore RJ., Smith HR., Friedman DP., Porrino LJ. (2002) Effects of cocaine self-administration on striatal dopamine systems in rhesus monkeys: initial and chronic exposure. *Neuropsychopharmacology.* 27(1):35-46.
133. Nader MA., Morgan D., Gage HD., Nader SH., Calhoun TL, Buchheimer N., Ehrenkaufer R., Mach RH. (2006) PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys. *Nat Neurosci.* 9(8):1050-6.
134. Nimitvilai S, Herman M, You C, Arora DS, McElvain MA, Roberto M, Brodie MS. (2014) Dopamine D2 receptor desensitization by dopamine or corticotropin releasing factor in ventral tegmental area neurons is associated with increased glutamate release. *Neuropharmacology.* 82:28-40.
135. Nikolaus S., Antke C., Beu M., Müller H-M. (2010) Cortical GABA, striatal dopamine and midbrain serotonin as the key players in compulsive and anxiety disorders – results from in vivo imaging studies. *Reviews in Neurosciences.* 21(2):119-39.
136. O'Hara CM., Uhlend-Smith A, O'Malley KL., Todd RD. (1996) Inhibition of dopamine synthesis by dopamine D2 and D3 but not D4 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 277(1):186-92.
137. Ohzeki T, Hanaki K, Motozumi H, Ohtahara H, Ishitani N, Urashima H, Tsukuda T, Shiraki K, Sasaki S, Nakamura H, et al. (1993) Efficiency of bromocriptine administration for selective pituitary resistance to thyroid hormone. *Hormones Research.* 39(5-6):229-234.
138. Orth DN. (1995) Cushing's syndrome. *N Engl J Med.* 332(12):791-803.

139. Pallanti S., Hollander E. (2008) Obsessive-compulsive disorder spectrum as a scientific "metaphor". *CNS Spectr.* 13(9 Suppl 14):6-15.
140. Patel J, Mooslehner KA, Chan PM, Emson PC, Stamford JA. (2003) Presynaptic control of striatal dopamine neurotransmission in adult vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) mutant mice. *J Neurochem.* 85(4):898-910.
141. Paxinos G., Watson C. (1997). *The rat brain.* Academic Press.
142. Perani D, Garibotto V, Gorini A, Moresco RM, Henin M, Panzacchi A, Matarrese M, Carpinelli A, Bellodi L, Fazio F. (2008) In vivo PET study of 5HT(2A) serotonin and D(2) dopamine dysfunction in drug-naïve obsessive-compulsive disorder. *Neuroimage.* 42(1):306-14.
143. Pfister C., Pfrommer H., Tatagiba MS., Roser F. (2013) Detection and quantification of farnesol-induced apoptosis in difficult primary cell cultures by TaqMan protein assay. *Apoptosis.* 18(4):452-66.
144. Piepponen TP., Skujins A. (2001) Rapid and sensitive step gradient assays of glutamate, glycine, taurine and gamma-aminobutyric acid by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection with o-phthalaldehyde-mercaptoethanol derivatization with an emphasis on microdialysis samples. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications* 757(2):277-83.
145. Pizarro M., Fontenelle LF., Paravidino DC., Yücel M., Miguel EC., de Menezes GB. (2014) An updated review of antidepressants with marked serotonergic effects in obsessive-compulsive disorder. *Expert Opin Pharmacother.* 15(10):1391-401.
146. Popova E., Bader M., Krivokharchenko A. (2005) Production of transgenic models in hypertension. *Methods Mol Med.* 108:33-50.
147. Rasmussen SA., Eisen JL. (1992) The epidemiology and differential diagnosis of obsessive compulsive disorder. *J. Clin. Psychiatry.* 53 Suppl:4-10.
148. Rasmussen SA., Eisen JL., Greenberg BD. (2013) Toward a neuroanatomy of obsessive-compulsive disorder revisited. *Biol Psychiatry.* 73(4):298-9.
149. Ridley RM. (1994) The psychology of perseverative and stereotyped behaviour. *Prog Neurobiol.* 44 (2): 221-31.
150. Rolls E. T. (2004) The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain Cogn.* 55(1), 11-29.
151. Romanelli RJ., Wu FM., Gamba R., Mojtabai R. Segal JB. (2014) Behavioral therapy and serotonin reuptake inhibitor pharmacotherapy in the treatment of obsessive-compulsive disorder: a systematic review and meta-analysis of head-to-head randomized controlled trials. *Depress Anxiety.* 31(8):641-52.
152. Rowlett JK., Mattingly BA., Bardo MT. (1995) Repeated quinpirole treatment: locomotor activity, dopamine synthesis, and effects of selective dopamine antagonists. *Synapse.* 20(3):209-16.

153. Salahpour A., Ramsey AJ., Medvedev IO., Kile B., Sotnikova TD., Holmstrand E., Ghisi V., Nicholls PJ., Wong L., Murphy K., Sesack SR., Wightman RM., Gainetdinov RR., Caron MG. (2008) Increased amphetamine-induced hyperactivity and reward in mice overexpressing the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(11):4405-10.
154. Sanes JN, Donoghue JP. (1993) Oscillations in local field potentials of the primate motor cortex during voluntary movement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(10):4470-4.
155. Saxena S., Bota RG. Brody AL. (2001) Brain-behavior relationships in obsessive-compulsive disorder. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry.* 6(2):82-101.
156. Saxena S., Brody AL., Schwartz JM. Baxter LR. (1998) Neuroimaging and frontal-subcortical circuitry in obsessive-compulsive disorder. *Br J Psychiatry Suppl.* (35):26-37.
157. Saxena S., Rauch SL. (2000) Functional neuroimaging and the neuroanatomy of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am.* 23(3), 563-86.
158. Schmitz Y., Benoit-Marand M., Gonon F., Sulzer D. (2003) Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. *J Neurochem.* 87(2):273-89.
159. Schwartz JM., Stoessel PW., Baxter LR., Martin KM., Phelps ME. (1996) Systematic changes in cerebral glucose metabolic rate after successful behavior modification treatment of obsessive compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 53:109–113.
160. Swartzman E, Shannon M, Lieu P, Chen SM, Mooney C, Wei E, Kuykendall J, Tan R, Settineri T, Egry L, Ruff D. (2010) Expanding applications of protein analysis using proximity ligation and qPCR. *Methods.* 50(4):S23-6.
161. Serra-Mestres J., Ring HA., Costa DC., Gacinovic S., Walker Z., Lees AJ., Robertson MM, Trimble MR. (2004) Dopamine transporter binding in Gilles de la Tourette syndrome: a [123I]FP-CIT/SPECT study. *MR. Acta Psychiatr Scand.* 109(2):140-6.
162. Shaw P., Sharp W., Sudre G., Wharton A., Greenstein D., Raznahan A., Evans A., Chakravarty MM., Lerch JP., Rapoport J. (2014) Subcortical and cortical morphological anomalies as an endophenotype in obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry.* doi: 10.1038/mp.2014.3. [Epub ahead of print]
163. Sibrava NJ., Boisseau CL., Mancebo MC., Eisen JL., Rasmussen SA. (2011) Prevalence and clinical characteristics of mental rituals in a longitudinal clinical sample of obsessive-compulsive disorder. *Depress Anxiety.* 28(10):892-8.
164. Singer HS., Butler IJ., Tune LE., Seifert WE. Jr, Coyle JT. (1982) Dopaminergic dysfunction in Tourette syndrome. *Ann Neurol.* 12(4):361-6.
165. Singer HS., Minzer K. (2003) Neurobiology of Tourette's syndrome: concepts of neuroanatomic localization and neurochemical abnormalities. *Brain Dev. Suppl 1:*S70-84.
166. Singer HS., Szymanski S., Giuliano J., Yokoi F., Dogan A. S., Brasic J. R., Zhou Y, Grace AA, Wong DF. (2002) Elevated intrasynaptic dopamine release in tourette's syndrome measured by PET. *Am J Psychiatry.* 159(8), 1329-36.

167. Harris K., Singer HS. (2006) Tic disorders: neural circuits, neurochemistry, and neuroimmunology. *J Child Neurol.* 21(8):678-89.
168. Skoog G., Skoog I. (1999) A 40-year follow-up of patients with obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 56(2):121-7.
169. Snider L. A. und Swedo S. E. (2000) Pediatric obsessive-compulsive disorder. *JAMA.* 284(24), 3104-6.
170. Sossi V, Dinelle K, Schulzer M, Mak E, Doudet DJ, de la Fuente-Fernández R. (2010) Levodopa and pramipexole effects on presynaptic dopamine PET markers and estimated dopamine release. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 37(12):2364-70.
171. Sperk G. (1982) Simultaneous determination of serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Neurochemistry.* 38(3):840-3.
172. Sperk G., Berger M., Hortnagl H., Hornykiewicz O. (1981). Kainic acid-induced changes of serotonin and dopamine metabolism in the striatum and substantia nigra of the rat. *European Journal of Pharmacology.* 74(4):279-86.
173. Stein D. J. (2002) Obsessive-compulsive disorder. *Lancet.* 360 (9330), 397-405.
174. Stokes AH., Hastings TG., Vrana KE. (1999) Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res* 55(6):659-65.
175. Subramaniam S, Lucki I, McGonigle P. (1992) Effects of chronic treatment with selective agonists on the subtypes of dopamine receptors. *Brain Res.* 571(2):313-22.
176. Subramaniam M., Soh P., Vaingankar JA., Picco L., Chong SA. (2013) Quality of life in obsessive-compulsive disorder: impact of the disorder and of treatment *CNS Drugs.* 27(5):367-83.
177. Sullivan RM, Talangbayan H, Einat H, Szechtman H. (1998) Effects of quinpirole on central dopamine systems in sensitized and non-sensitized rats. *Neuroscience.* 83(3):781-9.
178. Sunwoo YK, Bae JN, Hahm BJ, Lee DW, Park JI, Cho SJ, Lee JY, Kim JY, Chang SM, Jeon HJ, Cho MJ. (2011) Relationships of Mental Disorders and Weight Status in the Korean Adult Population *J Korean Med Sci.* 26(1):108–115.
179. Szechtman H, Dai H, Mustafa S, Einat H, Sullivan R. M. (1994) Effects of dose and interdose interval on locomotor sensitization to the dopamine agonist quinpirole. *Pharmacol Biochem Behav* 48(4):921-8.
180. Szechtman H., Eckert M. J., Tse W. S., Boersma J. T., Bonura C. A., McClelland J. Z., et al., (2001) Compulsive checking behavior of quinpirole-sensitized rats as an animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD): Form and control. *BMC Neurosci.* 2:4.
181. Szechtman H., Sulis W., Eilam D. (1998) Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: A potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behav Neurosci.* 112(6):1475-85.

182. Szumlinski KK., Allan M., Talangbayan H., Tracey A., Szechtman H. (1997) Locomotor sensitization to quinpirole: Environment-modulated increase in efficacy and context-dependent increase in potency. *Psychopharmacology (Berl)*, 134(2), 193-200.
183. Takeuchi Y., Sawada T., Blunt S., Jenner P., Marsden C.D. (1991) Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway on striatal serotonin innervation in adult rats. *Brain Res.* 562(2):301-5.
184. Taylor S. (2013) Molecular genetics of obsessive-compulsive disorder: a comprehensive meta-analysis of genetic association studies, *Molecular Psychiatry*. 18(7):799-80518.
185. Taylor S. (2011) Early versus late onset obsessive-compulsive disorder: evidence for distinct subtypes. *Clin Psychol Rev.* 31 (7) :1083-1100.
186. Thomsen PH. (2004) Risperidone augmentation in the treatment of severe adolescent OCD in SSRI-refractory cases: a case-series. *Ann Clin Psychiatry*. 16(4):201-7.
187. Thorpe S. J., Rolls E. T. Maddison S. (1983) The orbitofrontal cortex: neuronal activity in the behaving monkey. *Exp Brain Res.* 49(1), 93-115.
188. Tibbo P., Warneke L. (1999) Obsessive-compulsive disorder in schizophrenia: epidemiologic and biologic overlap. *J Psychiatry Neurosci.* 24(1):15-24.
189. Torres GE., Gainetdinov RR., Caron MG. (2003) Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci.* 4:13–25.
190. Truong JG., Hanson GR., Fleckenstein AE. (2004a) Apomorphine increases vesicular monoamine transporter-2 function: implications for neurodegeneration. *Eur J Pharmacol.* 492(2-3):143-7.
191. Truong JG., Newman AH., Hanson GR., Fleckenstein AE. (2004b) Dopamine D2 receptor activation increases vesicular dopamine uptake and redistributes vesicular monoamine transporter-2 protein. *Eur J Pharmacol.* 504(1-2):27-32.
192. Tucci MC, Dvorkin-Gheva A, Sharma R, Taji L, Cheon P, Peel J, Kirk A, Szechtman H (2014) Separate mechanisms for development and performance of compulsive checking in the quinpirole sensitization rat model of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Psychopharmacology (Berl)*. 231(18):3707-18.
193. Tzschantke TM., (2001) Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Prog Neurobiol.* 63(3):241-320.
194. Vallone D., Picetti R., Borrelli E. (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 24(1):125-32.
195. Uhlhaas PJ, Singer W. (2006) Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron.* 52(1):155-68.

196. Van der Wee NJ, Stevens H, Hardeman JA, Mandl RC, Denys DA, van Megen HJ, Kahn RS, Westenberg HM. (2004) Enhanced dopamine transporter density in psychotropic-naïve patients with obsessive-compulsive disorder shown by [<sup>123</sup>I]-β-CIT SPECT. *Am. J. Psychiatry*. 161(12):2201-6.
197. Van Kuyck K., Demeulemeester H., Feys H., De Weerd W., Dewil M., Tousseyn T., De Sutter P., Gybels J., Bogaerts K., Dom R., Nuttin B. (2003) Effects of electrical stimulation or lesion in nucleus accumbens on the behaviour of rats in a T-maze after administration of 8-OHDPAT or vehicle. *Behav Brain Res*. 140(1-2):165-73.
198. Ward HE, Hwynn N, Okun MS. (2010) Update on deep brain stimulation for neuropsychiatric disorders *Neurobiol Dis*. 38(3):346-53.
199. Weber AM., Soreni N., Noseworthy MD. (2014) A preliminary study of functional connectivity of medication naïve children with obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 53:129-36.
200. Winter C., Flash S., Klavir O., Klein J., Sohr R., Joel D. (2008b) The role of the subthalamic nucleus in compulsive' behavior in rats. *Eur J Neurosci*. 27(8):1902-11.
201. Winter C., Mundt A., Jalali R., Joel D., Harnack D., Morgenstern R., Juckel G., Kupsch A. (2008a) High frequency stimulation and temporary inactivation of the subthalamic nucleus reduce quinpirole-induced compulsive checking behavior in rats. *Exp Neurol*. 210(1):217-28.
202. Wise RA. (2002) Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron*. 36(2):229-40.
203. Wolf SS., Jones DW., Knable MB., Gorey JG., Lee KS., Hyde TM., Coppola R., Weinberger DR. (1996) Tourette syndrome: prediction of phenotypic variation in monozygotic twins by caudate nucleus D2 receptor binding. *Science*. 273(5279):1225-7.
204. Wong DF., Brasic JR., Singer HS., Schretlen DJ., Kuwabara H., Zhou Y., Nandi A., Maris MA., Alexaner M., Ye W., Rousset O., Kumar A., Szabo Z., Gjedde A., Grace AA. (2008) Mechanisms of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in Tourette syndrome: clues from an in vivo neurochemistry study with PET. *Neuropsychopharmacology*. 33(6):1239-51
205. Wong D. F., Singer H. S., Brandt J., Shaya E., Chen C., Brown J., et al., (1997) D2-Like dopamine receptor density in tourette syndrome measured by PET. *J Nucl Med*. 38(8):1243-7.
206. Wood MD., Wren PB. (2008) Serotonin-dopamine interactions: implications for the design of novel therapeutic agents for psychiatric disorders. *Prog Brain Res*. 172:213-30.
207. Yadin E., Friedman E., Bridger W. H. (1991) Spontaneous alternation behavior: an animal model for obsessive-compulsive disorder? *Pharmacol. Biochem. Behav*. 40(2):311-5.
208. Yoon DY., Rippel CA., Kobets AJ., Morris CM., Lee JE., Williams PN., Bridges DD., Vandenbergh. (2007) Dopaminergic polymorphisms in Tourette syndrome: association with the DAT gene (SLC6A3). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 144B(5):605-10.



209. Yoshioka W., Amino N., Ide A., Kang S., Kudo T., Nishihara E., Ito M., Nakamura H., Miyauchi A. (2014) Thyroxine treatment may be useful for subclinical hypothyroidism in patients with female infertility. *Endocr J.* [Epub ahead of print].
210. Zahn TP., Leonard HL., Swedo SE., Rapoport JL. (1996) Autonomic activity in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res.* 60(1):67-76.
211. Zhang H., Chen Z., Jia Z., Gong Q. (2014) Dysfunction of neural circuitry in depressive patients with suicidal behaviors: A review of structural and functional neuroimaging studies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 53:61-66.
212. Zahniser NR., Sorkin A. (2004) Rapid regulation of the dopamine transporter: role in stimulant addiction? *Neuropharmacology.* 47 Suppl 1:80-91.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. Christine Winter, für die intensive und fachliche Unterstützung, die wertvollen Hilfestellungen und nicht zuletzt für die Übernahme des zweiten Gutachtens bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Werner Kloas, für seine Diskussionsbereitschaft und die konstruktiven Ratschläge sowie die Übernahme des ersten Gutachtens bedanken.

Frau Prof. Dr. Imke Puls danke ich für die Kooperation zur Konstruktgenerierung der transgenen Tiere sowie ihrer Motivation und für die Übernahme des dritten Gutachtens.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Bader für die Kooperation zur Mikroinjektion der transgenen Tiere sowie die hilfreichen Diskussionen über genetisch veränderte Zuchtlinien.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich den wissenschaftlichen Mitarbeitern Frau S. Richter, Frau C. Kölske, Frau C. Winter und Herrn R. Sohr für ihre sachkundige Unterstützung und die Hilfsbereitschaft aussprechen.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Franziska, Julia, Mareike und Yosef für die gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinem Freund für die stete Unterstützung und ihren festen Glauben an mich.

## Publikationen

1. *DAT-overexpressing rats - a new animal model for repetitive behavior?*  
Kooperationspartner: Bader M., Puls I.; weitere Mitarbeiter: Wieske F., Callesen Edemann H., Hadar R., Avchalumov Y., Voget M., Kühn A., van Riesen C. (Manuskript in Vorbereitung)
2. Harmeier A., Meyer C., Willi R., **Reinel C.**, Obermüller S., Wozny C., Mory R., Metzler V., Chaboz S., Winter C., Schmitz D., Dernick G., Wettstein J., Iglesias A., Bettler B., Hoener M. *Characterization of trace amine-associated receptors 1 knock-out/ dsRed KI rats display amphetamine-induced hyperexcitability and altered social behavior.* (Manuskript).
3. Caton SJ., Bielohuby M., Bai Y., Spangler LJ., Burget L., Pfluger P., **Reinel C.**, Czisch M., Reincke M., Obici S., Kienzle E., Tschöp MH., Bidlingmaier M. (2012) *Low-carbohydrate high-fat diets in combination with daily exercise in rats: effects on body weight regulation, body composition and exercise capacity.* *Physiol. Behav.* 106(2):185-92.
4. Lesemann A., **Reinel C.**, Hühnchen P., Pilhatsch M., Hellweg R., Klaissle P., Winter C., Steiner B. (2012) *MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice.* *Brain Res.* 1457:51-69.
5. Schmidt MV., Czisch M., Sterlemann V., **Reinel C.**, Sämann P., Müller MB. (2009) *Chronic social stress during adolescence in mice alters fat distribution in late life: prevention by antidepressant treatment.* *Stress.* 12(1):89-94.

## Poster

*DAT-overexpressing rats - a new animal model for repetitive behavior?*

Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde; Berlin, 2014

*Multi disciplinary experiments investigating dopaminergic mechanisms of obsessive-compulsive disorders in different rat models of dopaminergic dysfunction*

Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde; Berlin, 2010, 2011, 2013. Society for Neuroscience; San Diego, 2010; Washington, 2011. Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie; München, 2011. Deutsche Gesellschaft für Psychologische Psychiatrie e. V., Heidelberg, 2012.

### **Vortrag**

*Multidisziplinäre Untersuchungen dopaminerger Mechanismen der Zwangsspektrumserkrankungen anhand unterschiedlicher Rattenmodelle dopaminerger Dysregulation*

Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie; München, 2011.

## Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass diese Dissertation in dieser oder anderer Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrundeliegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin. Wurden Ergebnisse in Kooperation produziert ist dies entsprechend angegeben.

Berlin, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Reinel Claudia